ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON HUMINSÄUREN AUS ABWASSER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLF BERGMANN
aus Halle/Saale

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0033

ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON HUMINSÄUREN AUS ABWASSER

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

UNIV. LIBRARY 1981

vorgelegt von

WOLF BERGMANN
aus Halle/Saale

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1978

Dekan:	Prof.Dr.W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof.Dr.E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof.Dr.W. Voelter

Abstract

BERGMANN, WOLF:

ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG VON HUMINSÄUREN AUS ABWASSER

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Huminsäuren aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen auf ihre Struktur untersucht. Die angewandten Isolierungs-, Aufarbeitungs-, Fraktionierungs- und Analyse-Methoden ermöglichten erste Einblicke in den Aufbau des Grundgerüstes von Huminsäuren aus Abwasser.

Nach Abspaltung der peripheren Bausteine aus dem Huminsäure-Molekül (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Metalle) und deren quantitativer und qualitativer Bestimmung, lag der Schwerpunkt auf der Fraktionierung und der Analyse des Grundgerüstes.

Mit Hilfe der Gelchromatographie gelang eine Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats in vier Struktureinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Bei der Untersuchung dieser vier Huminsäure-Untereinheiten waren herkömmliche Analysemethoden, wie Infrarotspektroskopie, UV-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse, Pyrolyse GC/MS etc. wenig aussagekräftig.

Entscheidend war der Einsatz der NMR-Spektroskopie. Sie gewährleistete einerseits eindeutige Aussagen über den Stand der Aufarbeitung, andererseits konnten Strukturbausteine aus dem Grundgerüst der Huminsäure identifiziert werden. Durch Kombinationsvergleich der 1-H- und 13-C-NMR-Spektren wurden in para-Stellung an Aromaten gebundene Äthylenoxide, Phenyläther und Alkylreste mit Carbonylfunktionen als Strukturelemente ermittelt. Die Ergebnisse konnten durch Vergleich mit Modellsubstanzen abgesichert werden.

Die identifizierten Bausteine bestätigen, daß die aromatischen Anteile im Huminsäure-Molekül nicht als hochkondensierte Strukturen vorliegen. Die Äthylenoxidbausteine, Phenylätherfunktionen und Alkylreste mit Carbonsäuregruppen können die Metallbindung im Huminsäure-Molekül erklären. Wie Vorversuche mit Proben aus verschiedenen Kläranlagen zeigen, sind die gefundenen Ergebnisse allgemein für Huminsäuren aus Abwasser charakteristisch. Die Bildung von Huminsäure durch Mikroorganismen scheint durch den Laborsyntheseversuch bewiesen zu sein.

MEINER MUTTER

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Februar 1976 bis Juli 1978 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Ernst Bayer,
danke ich für die Stellung des Themas, sein stetes Interesse und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr.K. Albert danke ich für viele wertvolle Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS:

		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Allgemeiner Teil	7
1.	Isolierung von Huminsäuren	7
1.1.	Isolierung mit Lauge	7
1.2.	Isolierung mit Säure	8
1.3.	Andere Isolierungsmethoden	8
2.	Versuche zur Strukturaufklärung von Huminsäure	10
2.1.	Hydrolytischer Abbau	10
2.2.	Oxidativer Abbau	11
2.3.	Reduktiver Abbau	13
2.4.	Biologischer Abbau	14
2.5.	Methode von Barton und Schnitzer	16
3.	Aufarbeitung von Huminsäure aus Abwasser	17
3.1.	Isolierung der nativen Huminsäure	17
3.2.	Auswahl der Kläranlage	19
4.	Charakterisierung des Huminsäure-Konzentrats	21
4.1.	Ausbeute an Huminsäure	22
4.2.	Elementaranalyse	22
4.3.	UV-Spektren von Huminsäuren	23
4.4.	Extinktions-Quotienten-Methode	25
4.5.	Konzentrationsbestimmung von Huminsäure aus Abwasser	26
4.6.	Komplexierte Metalle	27
5.	Kontaminations-Kontrollen	29
5.1.	Kontrolle auf nicht gebundene Peptide und Aminosäuren	29
5.2.	Kontrolle auf nicht gebundene Kohlenhydrate	32
6.	Gesamt-Aminosäure-Gehalt der Huminsäure	33
7.	Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalt der Huminsäure	36

8.	Abspaltung der peripheren Bausteine der Huminsäure	41
8.1.	Hydrolyse mit 6 N HCl	41
8.2.	Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats	42
8.3.	Modellhydrolyse	43
8.4.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	47
8.5.	UV-Spektren der hydrolysierten Huminsäure	49
8.6.	Infrarotspektroskopie	51
8.7.	Röntgenstrukturanalyse	53
8.8.	Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie	54
8.9.	Molekulargewichtsbestimmung	57
9.	NMR-Spektroskopische Untersuchungen	60
9.1.	1-H-NMR-Spektren der Huminsäure	60
9.1.1.	Zusammenfassung	66
9.1.2.	Protonenverteilung in den 1-H-NMR-Spektren der Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats	67
9.2.	13-C-NMR-Spektren der Huminsäure	67
9.2.1.	Zusammenfassung	72
9.3.	Kombinationsvergleich der 1-H- und 13-C-NMR-Spektren von Huminsäure aus Abwasser	74
9.4.	NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Humussäure und Ligninsulfonsäure	79
9.4.1.	Protonenverteilung im 1-H-NMR-Spektrum der Ligninsulfonsäure	79
9.4.2.	Kombinationsvergleich der 1-H- und 13-C-NMR-Spektren von Huminsäure und Ligninsulfonsäure	81
9.4.3.	Zusammenfassung	82
9.5	NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Modellsubstanzen	83
9.5.1.	1-H-NMR-Spektren von Modellsubstanzen	83
9.5.2.	13-C-NMR-Spektren von Modellsubstanzen	90
9.6.	Zusammenfassende Interpretation der NMR-Spektroskopischen Untersuchungen	96
9.7.	Diskussion	100

10.	Zur Herkunft der Huminsäure	103
10.1	Mikrobiologische Darstellung von Huminsäure	103
10.2.	Analyse des Zulaufs der Kläranlage Kirchentellinsfurt	103
10.3.	Allgemeine Aussagekraft der Ergebnisse	104
III.	Experimenteller Teil	105
1.	Probenaufarbeitung	105
2.	Vorproben auf Kontaminationen	109
2.1.	Aminosäuren und Peptide	109
2.2.	Kohlenhydrate	110
3.	Bestimmung des Gesamt-Aminosäure-Gehalts der Huminsäure	111
3.1.	Alkalische Hydrolyse	111
3.2.	Aminosäure-Analysator	111
4.	Hydrolyse mit 6 N HCl	113
4.1.	Verluste bei der Hydrolyse	113
4.2.	Aufarbeitung des Hydrolysats	113
4.3.	Modellhydrolyse	114
5.	Bestimmung des Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalts der Huminsäure	115
5.1.	Anthron-Reaktion	115
5.2.	Hydrolyse mit Trifluoressigsäure	116
5.3.	Kohlenhydrat-Analysator	116
6.	Röntgenogramm	117
7.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	118
8.	Pyrolyse GC/MS	119

9.	Molekulargewichtsbestimmung	120
9.1.	Präparative Ultrazentrifugation	120
9.2.	Felddesorption	120
10.	NMR-Spektroskopische Untersuchung der Huminsäure	121
10.1.	1-H-NMR-Spektren	121
10.2.	13-C-NMR-Spektren	122
11.	Darstellung von Modellsubstanzen	124
12.	Mikrobiologische Darstellung von Huminsäure	126
IV.	Zusammenfassung	127
V.	Literaturverzeichnis	129

Verzeichnis der Abkürzungen:

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ABHA	Acid Boiled Humic Acid
GC	Gaschromatographie
HS	Huminsäure
HS-K	Huminsäure-Konzentrat
IR	Infrarot
i.V.	im Vakuum
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
PEG	Polyäthylenglykol
ppm	parts per million
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TSB	Tryptic Soy Broth
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

I. Einleitung und Problemstellung

Huminsäuren sind hochmolekulare, komplexe Naturstoffe, die im Boden aber auch im Wasser vorkommen. Sie gelten allgemein als Abbauprodukte von Ligninen (1-5) und als Endprodukte bei der Fermentierung organischer Abfälle (6-16).

60×10^{11} t des organisch gebundenen Kohlenstoffs liegen in Form von Huminsäuren vor (17). Das entspricht auf dem Festland 8 % (13) und im Meeres-Sediment 5-10 % (18) des organisch gebundenen Kohlenstoffs, der hauptsächlich als Erdöl und Kohle vorliegt. Hierbei ist die Menge der im Wasser gelösten Huminsäuren noch nicht mitberücksichtigt.

Demgegenüber macht zum Beispiel der Anteil des organisch gebundenen Kohlenstoffs aller lebenden Organismen nur 7×10^{11} t aus (17). Trotz des hohen Vorkommens von Huminsäuren in der Natur ist wenig über die chemische Struktur dieses komplexen Stoffes bekannt. Die bisher vorliegenden Ergebnisse stammen im Wesentlichen aus Untersuchungen von Boden-, Torf- und Kohle-Huminsäuren (7,9, 13,14,19). Erste Einblicke in den Aufbau des Huminsäure-Moleküls wurden mit Hilfe drastischer chemischer Abbau- und Derivatisierungs-Methoden erzielt (siehe Allgemeiner Teil).

Nach den vorliegenden Ergebnissen besteht das Molekül aus einer zentralen Grundstruktur und aus peripheren Bausteinen. Dabei sind die einzelnen polyfunktionellen, heterogenen Strukturelemente verschiedenartig miteinander verbunden (20,21,22). Die zentrale Struktur weist einen hohen Vernetzungsgrad auf (hohe Aromatizität) und die peripheren Strukturbausteine enthalten Aminosäuren, Peptide, Kohlenhydrate und andere Komponenten, wobei diese über funktionelle Gruppe mit der zentralen Struktur (dem Grundgerüst oder Core) verknüpft sind (23-27). Siehe hierzu auch Abbildung 1.

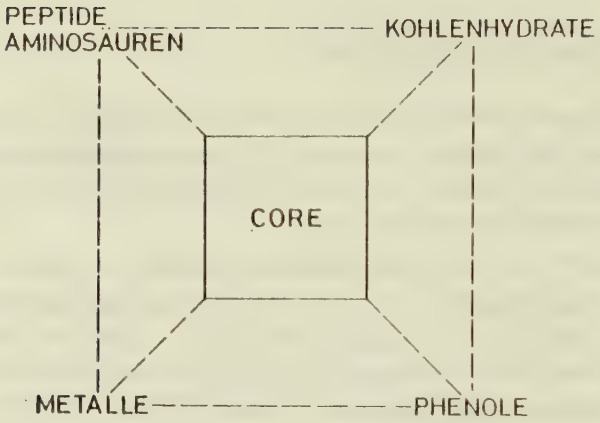


Abbildung 1: Huminsäure-Konstitutionsschema nach Haworth et al. (22, 26).

Nach Wershaw (28) können Teile ähnlicher chemischer Struktur und Teile unterschiedlicher chemischer Struktur im Huminsäure-Molekül aneinander gebunden sein. Er unterscheidet demnach zwischen Anteilen homogener und gemischter Aggregation. Wie die einzelnen Struktureinheiten aussehen und wie sie miteinander verbunden sind, um schließlich das komplexe Makromolekül zu bilden, ist aber unklar. Bis heute läßt sich für das Huminsäure-Molekül keine Formel angeben, und es können auch keine einheitlichen chemischen und physikalischen Daten - wie Festpunkt, Schmelzpunkt oder Molekulargewicht - zur Charakterisierung herangezogen werden. Allein die Angaben zum Molekulargewicht der Huminsäuren schwanken zum Beispiel je nach Bestimmungsmethode, Herkunft der Huminsäure

und Autor zwischen ca. 800 und einigen 100 000 dalton (7, 29-33).

In zahllosen Veröffentlichungen wird eine Fülle von Fakten und Interpretationen über das Huminsäure-Molekül dargelegt. Neben Gewinnung, Auftrennung und Charakterisierung - besonders der Boden-Huminsäuren - werden hauptsächlich die Eigenschaften dieses hochmolekularen Naturstoffs beschrieben, wie Ionenaustauscher-Fähigkeiten, Adsorptions- und Komplexbildungsvorgänge mit organischen und anorganischen Komponenten.

Bindung, Austausch, Freisetzung und Transport organischer und anorganischer Substanzen sind für die Umweltforschung von erheblicher Bedeutung. Aufgrund der verstärkten Kontrolle von Abwässern und Gewässern auf Kontaminationen und Inhaltsstoffe wurden in den letzten Jahren auch Huminsäuren aus Wasser untersucht. Sowohl deren toxische Wirkung (34-37), als auch die gelb-braune Farbe gaben den Anstoß. Die verschiedenartigsten Extraktionsmethoden wurden entwickelt und versuchsweise eingesetzt, um die Huminsäure aus dem Wasser zu eliminieren (38-52). Eine wirtschaftliche, allgemein anwendbare Methode konnte aber bis heute nicht gefunden werden. Das größte Hindernis für ein besseres Verstehen der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Huminsäuren, sowie für die Entwicklung effektiverer Extraktionsmethoden, ist das ungenügende Wissen über die chemische Struktur dieser Naturstoffe. Die verstärkte Grundlagenforschung zur chemischen Strukturaufklärung ist für die praktischen Probleme mit diesen Stoffen von entscheidender Bedeutung.

Die Huminsäuren aus Wasser gehören zu den schwer aubbaubaren, gelösten organischen Wasserinhaltsstoffen, die in Oberflächenwässern, in Sedimenten und auch im Trinkwasser nachzuweisen sind. Huminsäuren erniedrigen die Oberflächenspannung des Wassers beträchtlich (14,53) und wirken als Lösungsvermittler für hydrophobe Substanzen (54,55). Aufgrund ihrer Eigenschaften können sie zum Beispiel auch als DDT-Carrier fungieren und erhöhen die Mobilität dieses sonst stark wasserunlöslichen Insecticids (56,57). Ebenso stellt die adsorptive Wirkung auf Herbicide, Pesticide und andere Insecticide eine erhebliche Umweltbelastung dar (58-61).

Durch Adsorption von Prometrin (62), Paraquat (63) oder S-Triazin (64,65) und deren Desorption je nach den äußeren Bedingungen wird die toxische Wirkung der Huminsäure gesteigert. Aktivität, Lebensdauer und Mobilität umweltbelastender Stoffe werden stark beeinflußt.

Huminsäuren bilden auch stabile wasserlösliche und wasserunlösliche Komplexe mit Metallen und Metall-Hydroxiden. Polyvalente Kationen mit hohem Atomgewicht werden am stärksten gebunden. Der Anreicherungsfaktor ist von Metall zu Metall verschieden. Für Uran beträgt er zum Beispiel 10 000 zu 1 aus sehr niederen Konzentrationen in natürlichen Gewässern (66). Ebenso werden Gold, Schwermetalle und die meisten Kernspaltungsprodukte von Huminsäure komplexiert. Das macht diese Komplexe - besonders bei weiterer Verknappung der Resourcen - auch vom wirtschaftlichen Gesichtspunkt her interessant. Gleichzeitig ergibt sich aber bei Remobilisierung dieser Schadstoffe eine Gefährdung für die Umwelt. Es können unter anderem Kernspaltungsprodukte - die aus dem Kühlwasser von Atomkraftwerken stammen - oder komplexierte Schwermetalle (besonders bei niederen pH-Werten) aus dem Huminsäure-Molekül freigesetzt werden. So stellt zum Beispiel die hohe Schwermetallbelastung des Neckars (mit Cd und Pb) und der hohe Anteil gebundener Schwermetalle im Neckar-Sediment (wasserunlösliche Huminsäure-Komplexe) eine potentielle Gefahr für die Trinkwasser-Hygiene dar (67,68,69). Die chemischen und physikalischen Grundlagen für diese Eigenschaften der Huminsäure können aber erst geklärt werden, wenn genauere Informationen über die chemische Struktur zur Verfügung stehen.

Jedes Gewässer enthält durch natürlichen Eintrag - wie zum Beispiel Auswaschen von Gestein und Boden - und durch biologische Abbau- und Produktions-Prozesse von Plankton und Mikroorganismen, sowie durch Ausscheidungsprodukte von Pflanzen und Tieren eine gewisse Menge an gelösten organischen Substanzen, zu denen auch die Huminsäuren gehören. Diese Substanzen unterliegen - je nach ihrer biologischen Resistenz - mehr oder weniger einem natürlichen Abbau- oder Mineralisationsprozeß und stehen in einem Gleichgewicht zueinander. Das Gleichgewicht wird beeinflußt durch Zufuhr von Substraten über belastete Abwässer.

Bei der organischen Belastung der Abwässer muß man unterscheiden zwischen leicht und schwer abbaubaren Verbindungen. Die leicht abbaubaren organischen Substanzen - wie zum Beispiel Kohlenhydrate, Proteine, Fette etc. - kommen überwiegend aus nicht biologisch geklärten, häuslichen Abwässern.

Zu den schwer abbaubaren gelösten organischen Wasserinhaltsstoffen gehören - neben den organischen Verbindungen aus den Abwässern der chemischen und petrochemischen Industrie sowie organischen Chemikalien - auch die organischen Restsubstanzen aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen.

Untersuchungen über die Molekulargewichtsverteilung dieser Restsubstanzen zeigten, daß 76 % der Stoffe niedermolekular sind (70,71), die restlichen 24 % bilden die höhermolekulare Fraktion, in der auch die Huminsäuren enthalten sind (MW größer 700 dalton).

Die Huminsäuren im Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen können entweder aus dem Rohabwasser stammen oder sie entstehen im Laufe der biochemischen Reaktionen bei der biologischen Reinigung durch die Mikroorganismen. Sind die Huminsäuren im Rohabwasser bereits vorhanden, so ergeben sich zwei Möglichkeiten

a) hydrophile Anteile der Boden-Huminsäure werden aus dem Boden oder aus Sedimenten ausgewaschen,
b) die Huminsäuren werden bereits im Rohabwasser von Mikroorganismen synthetisiert und durchlaufen den Reinignungsprozeß unverändert (sie sind biochemisch inert).

Entstehen die Huminsäuren im Laufe der biochemischen Vorgänge bei der biologischen Reinigung, so werden sie

a) entweder bei Abbau der leicht metabolisierbaren organischen Substrate durch Mikroorganismen gebildet

oder

b) sie werden bei der Autolyse des Belebtschlamms der Anlage freigesetzt.

Die tatsächlich ablaufenden Prozesse sind sehr komplex, da verschiedene Kombinationen der einzelnen Möglichkeiten auftreten können.

Eine endgültige Klärung der Fragen ist auch hier nur mit der vollständigen Strukturaufklärung des Huminsäure-Moleküls möglich.

In Relation zur Häufigkeit der Huminsäuren in der Natur ist so gut wie garnichts über Synthesewege, die biochemischen Abbau- und Umbau-Reaktionen und über die chemische Struktur dieses komplexen Moleküls bekannt.

Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Huminsäuren aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen untersucht. Aufgabe war die Isolierung des nativen Huminsäure-Moleküls aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen,mit dem Ziel, nach Abspaltung der peripheren Bausteine eine Analyse des Grundgerüstes durchzuführen. Die Untersuchungen sollten auch die Frage beantworten, ob in der biologischen Stufe von Kläranlagen eine völlig neue Verbindungsklasse gebildet wird, oder ob die isolierten Huminsäuren ähnliche Strukturmerkmale wie die Boden-Huminsäuren aufweisen. Somit könnten Aussagen über die Humifizierungsprozesse im Wasser und im Boden und über die Entstehung der Huminsäuren gemacht werden.

Die Identifizierung von Strukturbausteinen aus dem Grundgerüst des Huminsäure-Moleküls liefert einen wertvollen Beitrag zur Strukturaufklärung dieser Verbindungsklasse und somit zur Klärung der anstehenden Fragen und Probleme.

II. Allgemeiner Teil

1. Isolierung von Huminsäuren

Bei der Analyse von Naturstoffen spielt die angewandte Isolierungs- und Reinigungsmethode eine entscheidende Rolle. Einerseits soll eine möglichst effektive Anreicherungsmethode gefunden werden, andererseits sollten dabei Kontaminationen sowie Veränderungen im Naturstoffmolekül ausgeschlossen sein.

1.1. Isolierung mit Lauge

Die allgemeingängige Methode zur Isolierung von Huminsäure ist das Auslaugen von Bodenproben mit Alkali. Man läßt 0,5 %ige wäßrige Natronlauge mehrere Stunden auf die Proben einwirken, filtriert ab und gewinnt so die 'Roh-Huminsäure'.

Bei dieser Methode ergeben sich zwei Schwierigkeiten, die eine exakte Analyse der Huminsäure zweifelhaft machen

a) das Huminsäure-Molekül wird bereits hydrolytisch verändert

b) organische und anorganische Substanzen werden mitextrahiert

In der Tat wurden Veränderungen am Huminsäure-Molekül bei Extraktion mit Alkali beobachtet. Die Aufnahme von Sauerstoff und die Abgabe von Kohlendioxid ist festgestellt worden. Im Alkalischen kann eine Autoxidation der Huminsäure bei Luftzufuhr eintreten (7,14) bzw. beginnt die hydrolytische Spaltung und die Decarboxylierung.

Auch eine Stabilisierung des Extrakts mit Zinn(II)chlorid brachte keine Verbesserung, da es ein starkes Reduktionsmittel ist und seinerseits zu Reaktionen im Huminsäure-Molekül führen kann. Außerdem werden Metallhydroxide, Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren als Verunreinigungen mitextrahiert.

Die Bildung von Artefakten und die Kontamination der Extrakte sind bei dieser Methode nicht auszuschließen.

1.2. Isolierung mit Säure

Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich bei der Ausfällung von Huminsäuren mit HCl oder HF unterschiedlicher Normalität. Die Säure greift die peripheren Bausteine des Huminsäure-Moleküls an und spaltet Bruchstücke ab, die unter Umständen weiterreagieren und Artefakte bilden. Die Methode wird heute noch vielfach zur Fällung und Reinigung von Huminsäuren eingesetzt (47), was aber - unter Berücksichtigung der Nebeneffekte - nicht empfehlenswert erscheint.

1.3. Andere Isolierungsmethoden

Die Ausfällung von Huminsäuren mit Salzen, wie zum Beispiel mit 0.1 M $Na_4P_2O_7$ in wäßriger Lösung (bei pH = 7) oder mit Na_3PO_4 und Na_2CO_3 hat sich nicht bewährt, denn

a) das Huminsäure-Molekül komplexiert die Salze, und bei deren Abtrennung mit Säure können Veränderungen im Molekül hervorgerufen werden (siehe oben).
b) andere Komplexbildner können mitisoliert werden.

Ebensowenig effektiv ist die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Hexamethylentetramin, Dodecylsulfat, Harnstofflösungen, Ameisensäure oder Dimethylformamid. Diese Verfahren werden kaum eingesetzt, da

a) die Lösungsmittel zum Teil auf das Huminsäure-Molekül einwirken (Veränderungen in der Peripherie)
b) durch die Wahl des Lösungsmittels (Polarität) bereits eine Selektion getroffen wird.

Eine Isolierung des nativen Huminsäure-Moleküls ist damit nicht abgesichert.

Bei der Isolierung von Huminsäuren ausWasser werden auch Schwermetall-Salze eingesetzt (siehe Einleitung), die aber durch Behandlung mit Säuren (HCl/HF) wieder abgespalten werden müssen. Hierbei ergeben sich ähnliche Probleme wie oben beschrieben.

Die herkömmlichen Methoden zur Isolierung von Huminsäuren führen zu Veränderungen im Molekül und zu zusätzlichen Verunreinigungen. Teilweise werden auch Artefakte gebildet. Keine der Methoden gewährleistet eine Extraktion des nativen Huminsäure-Moleküls. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Problemstellung erfordert aber eine schonende Isolierungsmethode für die Huminsäuren aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen, welche Verunreinigungen, Veränderungen im Huminsäure-Molekül und Artefaktenbildung weitgehend ausschließt.

Die hier ausgewählte Ultrafiltrationstechnik wurde diesen Anforderungen gerecht (72-75) und konnte erfolgreich zur Anreicherung und Reinigung der Huminsäure eingesetzt werden.

2. Versuche zur Strukturaufklärung von Huminsäure

Die Analyse der unfraktionierten Huminsäure mit herkömmlichen spektroskopischen Methoden läßt keine differenzierte Aussage über die chemische Struktur zu. Die Komplexität des Moleküls erschwert die exakte Analyse der einzelnen Bausteine. Allgemeine, wenig detaillierte Angaben sind in der UV-, IR- und NMR-Spektroskopie möglich (siehe dort). Eine Identifizierung von Strukturbausteinen ist mit diesen Methoden jedoch nicht gelungen.

Um identifizierbare Bruchstücke zu bekommen, ist eine Fraktionierung des Huminsäure-Moleküls unerläßlich.

Die unterschiedlichsten, meist chemischen Abbaumethoden sind hierzu schon eingesetz worden. Die Schwierigkeit war, eine Methode zu finden, die weder zu mild (keine Fraktionierung) noch zu drastisch (Abbau bis zu Kohlendioxid, Wasser, Oxalsäure und Essigsäure) in die chemische Struktur des Huminsäure-Moleküls eingreift.

2.1. Hydrolytischer Abbau

Die hydrolytischen Methoden betreffen im Wesentlichen die peripheren Bausteine der Huminsäure.

Beim längeren Kochen mit Wasser lassen sich nur geringe Mengen von Kohlenhydraten und Aminosäuren abspalten und identifizieren (26,76).

Die Hydrolyse mit Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure oder Perchlorsäure) kann je nach Bedingungen zu einer vollständigen Abspaltung der peripheren Bausteine führen und erlaubt auch eine qualitative und quantitative Bestimmung der freigesetzten Bruchstücke.

Die Grundstruktur des Huminsäure-Moleküls wird aber durch diese Methoden nicht beeinflußt, da eine Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften oder das Auftreten größerer Bruchstücke bisher nicht beobachtet wurden. Gefundene ätherextrahierbare Anteile (14), wie

zum Beispiel Vanillin, sind auf Verunreinigungen bei der Anreicherung zurückzuführen.

Bei der Hydrolyse mit Alkali (5 N NaOH oder KOH) besteht die Gefahr der Artefakt bildung durch Autoxidation. Abgespaltene Kohlenhydrate und Phenolderivate (77) aus der Peripherie können unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse Polymerisations-Reaktionen eingehen und somit Sekundär-Produkte liefern, die keinen Hinweis auf die Struktur des Huminsäure-Moleküls zulassen (78).

Versuche zur enzymatischen Abspaltung der peripheren Bausteine scheiterten bisher an der Spezifität der eingesetzten Enzyme sowie an der inhibitorischen Wirkung der Huminsäure selbst (79-85).

Mit Hilfe der hydrolytischen Abbaumethoden kann ein Einblick in die peripheren Bausteine des Huminsäure-Moleküls gewonnen werden. Für eine Identifizierung von Strukturbausteinen aus dem Grundgerüst sind diese Methoden allein jedoch nicht ausreichend.

2.2.Oxidativer Abbau

Der oxidative Abbau ist aufgrund des hohen Sauerstoff-Gehalts der Huminsäure gegenüber dem reduktiven Abbau begünstigt.

Allerdings ergeben sich bei der alkalischen Nitrobenzol-Oxidation (86,87) und bei der CuO-NaOH-Oxidation (23,88) des bereits säurehydrolysierten Huminsäure-Moleküls nur unbedeutende Hinweise auf verschiedene Benzoesäuren und Phenolderivate, deren Anteile aber unter 1 % liegen. Es lassen sich keine Komponenten nachweisen, die für die chemische Struktur des Ausgangsmaterials von Bedeutung sein können (Grundgerüst).

Die Oxidation mit alkalischer $KMnO_4$-Lösung stellt demgegenüber eine sehr drastische Methode dar, die eine Reihe von Substanzen liefert (89). In Modellversuchen zeigte sich aber, daß zum Beispiel O-substituierte Benzolringe zu Kohlendioxid, Wasser und Oxalsäure abgebaut werden und, daß entstehende Benzolcarbonsäuren aus C-substituierten aromatischen Ringen stammen können. Die genaue Herkunft der Substanzen läßt sich schwer bestimmen, denn es ist nicht

bekannt, auf welche Art abgespaltene Bruchstücke mit dem Restmolekül weiterreagieren. Die Oxidation der peripheren Bausteine kann über die Bildung von Sekundärprodukten zu Fehlinterpretationen führen. Auch die Oxidation methylierter Huminsäure in alkalischer $KMnO_4$-Lösung brachte keine Klärung. Bei neueren Untersuchungen konnten nur Zersetzungsprodukte, aber keine Strukturbausteine nachgewiesen werden (90).

Der oxidative Abbau des Huminsäure-Moleküls mit H_2O_2 (91) war ebensowenig erfolgreich. Hierbei entstanden in der Hauptsache Kohlendioxid und Wasser.

Positive Hinweise auf C-C oder C-O -Bindungen an aromatischen Ringen ergaben sich bei der Oxidation mit Salpetersäure. Huminsäuren wurden mehrere Tage mit 2 N oder 7.5 N NHO_3 unter Rückfluß gekocht. Durch fraktionierte Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität und anschließende chromatographische Trennung gelang die Identifizierung verschiedener Nitroderivate, wie zum Beispiel Pikrinsäure, Nitrophenol etc., die auf C-C und C-O--Bindungen im Huminsäure-Molekül hindeuten.

Beim oxidativen Abbau gehen die Aussagen über Hinweise nicht hinaus. Eine Schwierigkeit ist die fehlende Kontrolle über die ablaufenden chemischen Reaktionen, besonders mit den peripheren Bausteinen. Artefaktbildung ist nicht ausgeschlossen. Die Herkunft der Verbindungen ist schwer zu bestimmen. Inwieweit die identifizierten Komponenten Rückschlüsse auf die Struktur des Ausgangsmaterials zulassen, ist fraglich. Verunreinigungen durch die Extraktionsmethode erschweren die Interpretation der Ergebnisse.

2.3. Reduktiver Abbau

Eine einfache Methode ist die Zinkstaubdestillation. Sie wird oft angewandt. Ihre Nachteile sind aber

a) die notwendige hohe Temperatur (400-500° C), die zur Spaltung aber auch zu Umlagerungsreaktionen führen kann,

und

b) die niedrigen Ausbeuten.

Bei der Zinkstaubdestillation (22, 92, 93) wurden polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe gefunden. Aus diesen Ergebnissen schließen Cheshire et al. (22,78) auf ein polycyclisches Grundgerüst und hydrolysierbare Anteile. Die geringen Ausbeuten an polycyclischen Ringsystemen (Naphtalin, Anthracen, Coronen etc.), nach chromatographischer Auftrennung der Reduktionsprodukte, deuten aber nicht auf signifikante Strukturbausteine aus dem Huminsäure-Molekül, sondern eher auf Sekundärprodukte, die unter den gegebenen Bedingungen entstanden sind.

Problematisch ist auch die Reduktion mit Na-Amalgam (3 Stunden mit Na-Amalgam-Überschuß in 1 %iger NaOH-Lösung bei 100-110° C unter Stickstoff). Nach Ende der Reaktion ist eine Identifizierung der Spaltprodukte im Ätherextrakt noch nicht gelungen, da sofort Autoxidation eintritt (stark alkalische Lösung) (14,94,95).

Bisher identifizierte Vanillin-, Guaiacyl- und Syringylderivate sind auf Verunreinigungen durch Ligninsulfonsäure zurückzuführen.

Die geringen Ausbeuten beim reduktiven Abbau lassen auf methodisch bedingte Artefaktbildung schließen. Signifikante Strukturbausteine konnten nicht identifiziert werden. Auch hier ergeben sich Fehlinterpretationen aus den Verunreinigungen, die zum Teil auf die Extraktionsmethode zurückzuführen sind.

2.4. Biologischer Abbau

Die wenigen bisher durchgeführten Versuche auf diesem Gebiet wollen mit Hilfe biochemischer Methoden einen Beitrag zur Strukturaufklärung der Huminsäure leisten.

Huminsäuren sind biologisch schwer abbaubare Stoffe. Ihre hohe Verweildauer in Böden, Sedimenten und Gewässern bestätigt dies. Aufgrund der unterschiedlichsten Wechselwirkungen zwischen dem Huminsäure-Molekül und seiner jeweiligen Umgebung (siehe Abb. 2) und den vielfältigen Ab-, Auf- und Umbaureaktionen ist auch die Frage nach der biologischen Resistenz dieser Verbindungsklasse eine Frage nach der chemischen Struktur. Einfach strukturierte

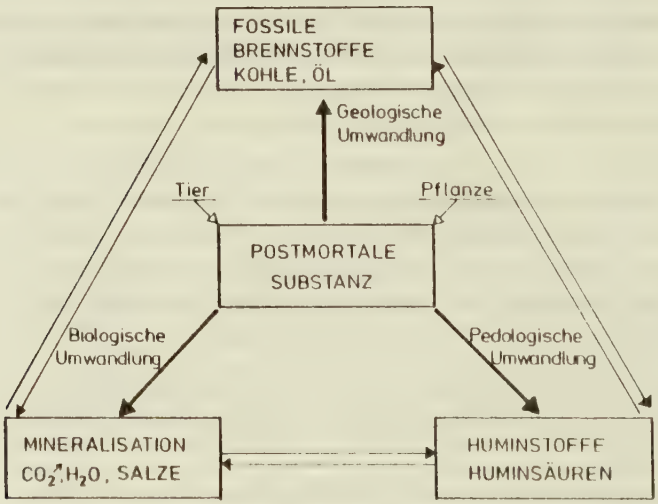


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Abbau- und Umbau-Vorgänge im Boden.

Moleküle werden in der Regel sofort durch Mikroorganismen abgebaut, wohingegen komplizierte Moleküle wie Huminsäuren verschiedenen Wechselwirkungen ausgesetzt sind. Die biologische Resistenz kann zum Beispiel durch Adsorption der Exoenzyme der Mikroorganismen an das Huminsäure-Molekül hervorgerufen werden (sterische Hinderung). Der biochemische Abbau der an das Huminsäure-Grundgerüst gebundenen Kohlenhydrate und Peptide ist somit gehemmt (79-85).

Ob dabei große Mengen des organisch gebundenen Kohlenstoffs in Form von Huminsäure dem natürlichen Kohlenstoff-Kreislauf entzogen werden, ist noch nicht geklärt (18, 96-100). Die Versuche, bestimmte Bakterien- und Pilzstämme auf Huminsäure als einziger C- und N-Quelle zu züchten, zeigen nach einer langen Inkubationsphase eine gewisse Adaption (101-103). Diese Adaption läßt sich entweder auf

a) die Selektion der Mikroorganismen durch das spezielle Nahrungsangebot,

oder

b) auf eine induzierte Enzymsynthese zurückführen.

Wie kann der biologische Abbau überhaupt Einblicke in die Struktur der Huminsäure geben?

Die Darstellung der Problematik zeigt, daß die Vorgänge sehr komplex sind. Es läßt sich nicht unterscheiden, welche Verbindungen von den Mikroorganismen gebildet werden bzw., welche Stoffe Reste oder Spaltprodukte der Huminsäure sind.

Der Einsatz dieser an und für sich eleganten Methode - bei der chemische Eingriffe ausgeschaltet sind - brachte bisher keine Vereinfachung, sondern eine Komplizierung der Analyse. Es fehlt ein Testverfahren, das entsprechende Aussagen über Auf-, Ab- und Umbaureaktionen durch die Mikroorganismen ermöglicht. Weiterführende Versuche auf diesem Gebiet sind erforderlich.

2.5. Methode von Barton und Schnitzer

Auch mit dieser Methode wird der Versuch unternommen ohne drastische chemische Verfahren Einblick in das native Huminsäure-Molekül zu bekommen.

Bei der Analyse von Boden-Huminsäuren konnten Barton und Schnitzer (4, 104, 105) mehr als einhundert organische Komponenten isolieren und identifizieren. Die Boden-Proben wurden mit Lösungsmitteln steigender Polarität extrahiert (zum Beispiel Hexan, Benzol, Äthylacetat). Die einzelnen Extrakte wurden auf Aluminium-Oxid-Säulen fraktioniert und über die Gaschromatographie-Massenspektrometrie bzw. die Mikro-Infrarotspektoskopie durch Vergleich mit Modellsubstanzen identifiziert. Mehr als 90 % der Substanzen konnten aber erst nach Methylierung erfolgreich isoliert und identifiziert werden.

Gefunden wurden, neben Alkanen und Fettsäuren, Dialkylphthalate, Phenol- und Benzolderivate. Also aliphatische und aromatische Bausteine. Die Methode lieferte bisher nur niedermolekulare Bruchstücke, die Rückschlüsse auf die Ausgangsstruktur (das Grundgerüst) erschweren. Hinzu kommen Kontaminationen je nach Umgebung der Huminsäure und je nach eingesetztem Lösungsmittel.

3. Aufarbeitung von Huminsäure aus Abwasser

3.1. Isolierung der nativen Huminsäure

Die meisten bisher angewandten Methoden zur Untersuchung der Huminsäuren verursachen drastische Veränderungen, und man erhält komplizierte Substanzgemische. Rückschlüsse auf Strukturelemente aus dem Grundgerüst sind nur begrenzt möglich. Die peripheren Bausteine stören oft, und definitive Aussagen können mit niedermolekularen Komponenten allein nicht gemacht werden.

Mit Sicherheit nachgewiesen wurden aromatische und aliphatische Anteile, wobei über deren Verhältnis zueinander keine Klarheit herrscht. Außerdem sind phenolische OH-Gruppen, Carboxylgruppen, Peptidbindungen (Aminosäuren), sowie gebundene Kohlenhydrate und komplexierte Metalle gefunden worden (siehe auch II.2.).

Wie die Erfahrungen mit den dargestellten chemischen Abbaumethoden zeigen, ist ein Fortschritt bei der Strukturaufklärung der Huminsäure eher mit weniger drastischen Verfahren zu erwarten. Die Untersuchungen von Barton und Schnitzer sind auf diesem Gebiet eine Pionierarbeit.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, nach Isolierung des nativen Huminsäure-Moleküls und nach Abspaltung der peripheren Bausteine, eine Analyse des Grundgerüstes durchzuführen. Um bei der Aufarbeitung sowohl Artefaktbildung als auch Veränderungen im Huminsäure-Molekül weitgehend auszuschalten, war es notwendig, neue Wege zu gehen und zum Beispiel bei der Isolierung keine chemischen Methoden anzuwenden.

Wenn mit Hilfe schonender Verfahren eine Fraktionierung des Grundgerüstes in höhermolekulare Anteile gelingt, kann deren Identifizierung erhebliche Fortschritte für die Strukturaufklärung bringen.

AUFARBEITUNGSSCHEMA

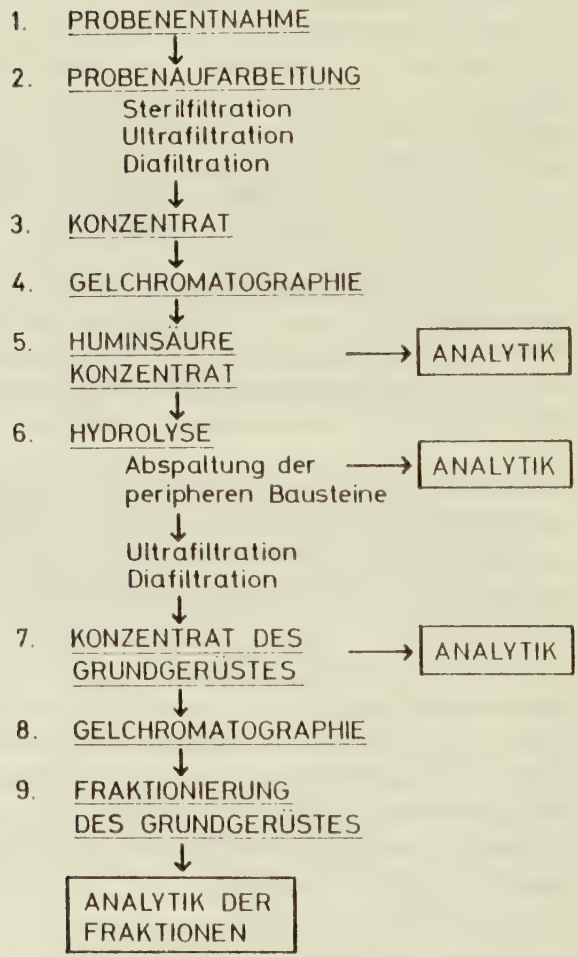


Abbildung 3: Kombination der ausgewählten Aufarbeitungsmethoden.

Voraussetzung dafür sind Methoden zur Isolierung des nativen Huminsäure-Moleküls aus Abwasser und zur schonenden Abspaltung der peripheren Bausteine.

Die Kombination der in dieser Arbeit ausgewählten Methoden erfüllt diese Bedingungen (siehe Abb. 3).

Die Isolierung, Anreicherung und Reinigung der nativen Huminsäure war, durch den erfolgreichen Einsatz der Ultrafiltrationstechnik in Verbindung mit der Gelchromatographie, möglich. Nach hydrolytischer Abspaltung der peripheren Bausteine und deren quantitativer und qualitativer Bestimmung, konnte das Huminsäure-Grundgerüst in höhermolekulare Bruchstücke fraktioniert werden. Zusätzliche Kontrollen auf Kontaminationen - wie zum Beispiel durch freie Aminosäuren oder Kohlenhydrate - und auf Artefaktbildung - wie zum Beispiel die Reaktion von Kohlenhydraten und Aminosäuren unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse - sichern reproduzierbare Ergebnisse ab.

Damit waren die Bedingungen für die Analyse von höhermolekularen Strukturbausteinen aus dem Grundgerüst der Huminsäure erfüllt.

3.2. Auswahl der Kläranlage

Um von vornherein Kontaminationen zu vermeiden, war es wichtig, die Huminsäure aus dem Ablauf einer mechanisch-biologischen Kläranlage zu isolieren, deren Zulauf von Störfaktoren wie Lignin-sulfonsäure (Sulfitablauge der papierverarbeitenden Industrie), phenolhaltigen Abwässern, allgemeinen Industrieabwässern oder sonstigen Spezialabwässern frei war.

Diese Bedingungen wurden im Raum Tübingen-Reutlingen am besten vom Klärwerk in Kirchentellinsfurt erfüllt. 97 % der dort anfallenden Abwässer sind häusliche Abwässer, Grundwässer oder Wässer aus der Landwirtschaft. Die restlichen 3 % stammen aus einem Textilbetrieb und von einem stahlverarbeitenden Unternehmen. Diese Industrieabwässer enthalten aber keine spezifischen Kontaminationen wie Farben, Säuren, Salze etc. Bei der Isolierung der Huminsäure aus dem Ablauf der Kläranlage Kirchentellinsfurt waren spezielle

Kontaminationen durch den Zulauf ausgeschaltet.

Gefahr für Kontamination der Ablauf-Proben bestand lediglich bei Oberlastung der Anlage sowie bei Regen. Bei Regen können durch die Straßenkanalisation zusätzliche organische Belastungen von ca. 5 - 15 mg/l Regenwasser auftreten (zum Beispiel Paraffine polycycliche Aromaten etc.; 106, 107). Bei Überbelastung der Anlage und bei Regen wurden keine Proben gezogen.

4. Charakterisierung des Huminsäure-Konzentrats

Das - wie unter III.1. beschrieben - angereicherte und gereinigte Huminsäure-Konzentrat wurde zur vollständigen Abtrennung niedermolekularer Anteile der Gelchromatographie unterzogen.

Wie das Elutionsdiagramm des Huminsäure-Konzentrats zeigt (siehe Abb. 4), tritt keine Fraktionierung ein. Der Elutionspeak deutet auf eine für Polymere charakteristische Molekulargewichtsverteilung hin (siehe auch S. 57). Die Elution beginnt mit dem Ausschlußvolumen ($v_0 = v_e$ = 125 ml). Die Fraktionen 27 bis 48 wurden gepoolt und bis zur Trockne eingeengt.

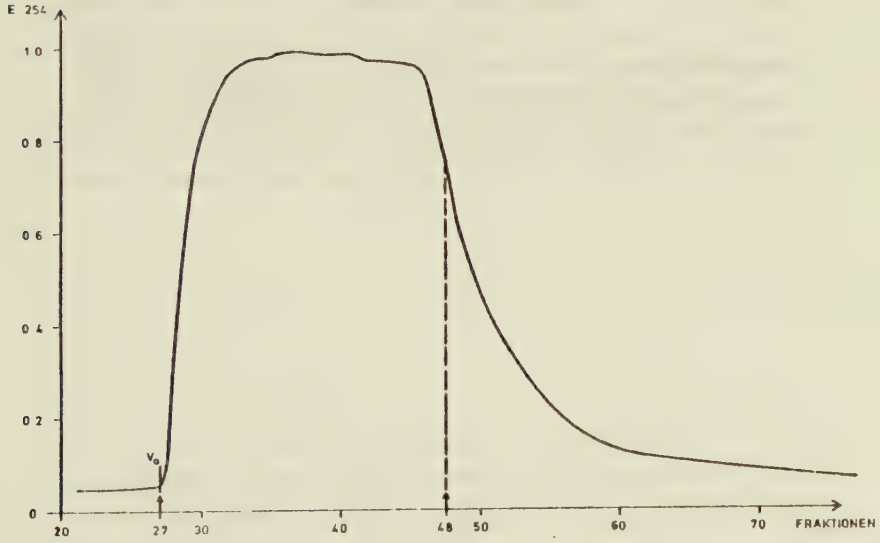


Abbildung 4: Elutionsdiagramm des Huminsäure-Konzentrats.
Experimentelle Bedingungen siehe III.1.

4.1. Ausbeute an Huminsäure

Die ultrafiltrierte und gelchromatographierte Huminsäure wurde gravimetrisch oder mit Hilfe von Eichgeraden (nach II.4.5.) spektralphotometrisch quantitativ bestimmt. Die gefundene Menge wurde auf 1 l Sterilfiltrat bezogen.

Ergebnis: 6 mg Huminsäure pro Liter Sterilfiltrat (Mittelwert).

4.2. Elementaranalyse[1)]

Element	C	H	N	S	O	
Anteil in %	35.61	4.29	3.10	2.00	55.00	Huminsäure aus Abwasser
	47.80	3.80	0.75	3.00	44.65	Humussäure aus Braunkohle

Die Werte sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei Humussäure aus Braunkohle (Roth) der C und S-Gehalt höher liegt und der Gehalt an H, N und O niedriger ist als bei der Huminsäure aus Abwasser.

---

1) Für die Durchführung der Elementaranalysen danke ich Herrn Wurmstich.

4.3. UV-Spektren von Huminsäuren

Die Absorptionsspektren von Huminsäure aus Abwasser, Humussäure aus Braunkohle (Roth) und Ligninsulfonsäure (Roth) sind in Abbildung 5 dargestellt.

In den Spektren der Huminsäure sind keine Maxima oder Minima detektierbar, sie sind vollkommen undifferenziert. Die Absorption steigt mit abnehmender Wellenlänge an, was auf erhöhte π-Elektronen-Beweglichkeit hindeutet. Das heißt, aromatische Kerne und konjungiert verknüpfte, ungesättigte Strukturen können vorliegen.

Bei den Huminsäuren aus Abwasser ist insgesamt ein stärkerer Anstieg der Absorption und eine höhere Endabsorption als bei Humussäure aus Braunkohle (Roth) festzustellen. Hier bestehen unter Umständen Unterschiede in der Zusammensetzung der Grundstruktur, zum Beispiel verschieden hohe Anteile an aromatischen Strukturen.

Wesentliche Unterschiede zu den Huminsäure-Spektren zeigt das Absorptionsspektrum der Ligninsulfonsäure (Roth). Bei ihr ist ein ausgeprägtes Maximum (λ_{max} = 280 nm) und ein Minimum (λ_{min} = 260 nm) vorhanden. Außerdem tritt eine noch stärkere Endabsorption auf als bei den Huminsäuren aus Abwasser. Der Anteil aromatischer Strukturen scheint bei Ligninsulfonsäure erheblich über dem der Huminsäure zu liegen (siehe auch II.9.4.3.).

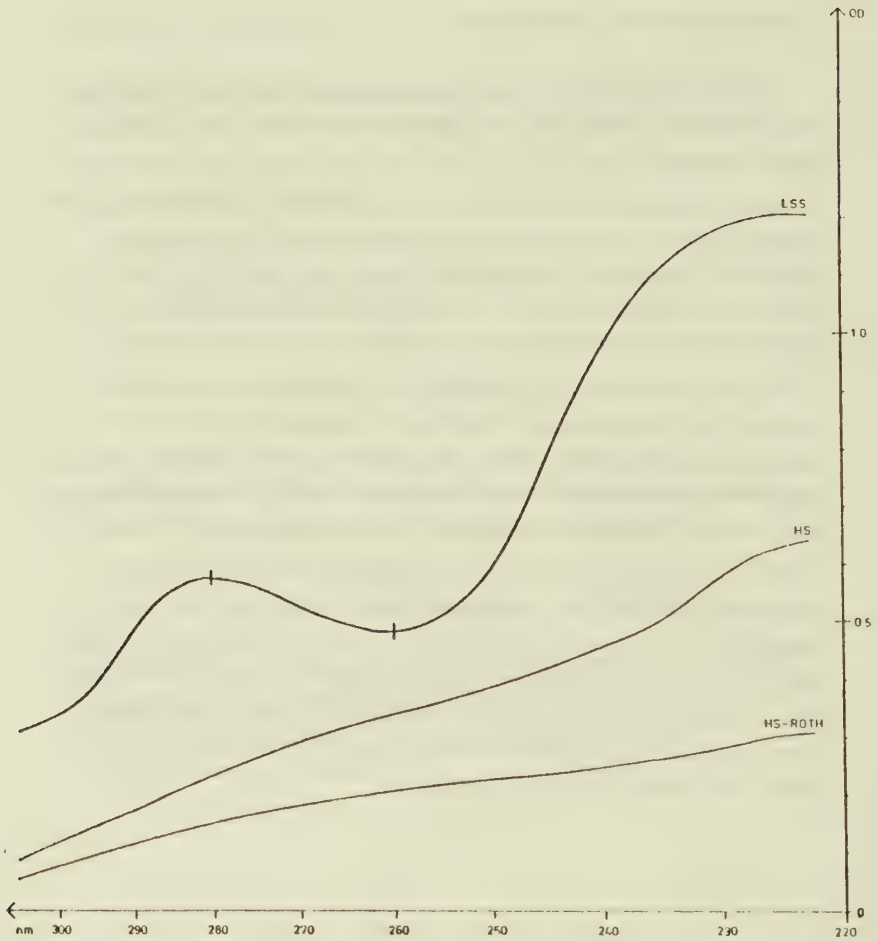


Abbildung 5: Absorptionsspektren von Ligninsulfonsäure (LSS), Humussäure aus Braunkohle (HS-Roth) und Huminsäure aus Abwasser (HS). Das Absorptionsspektrum der Huminsäure aus Abwasser ist für die Kläranlagen Kirchentellinsfurt, Eutingen, Steinlach-Wiesaz und die Laborkläranlage identisch.
Konzentration: je 10 mg/100 ml.

4.4. Extinktions-Quotienten-Methode

Da eine Klassifizierung der Huminsäure mit Hilfe der Absorptionsspektren aufgrund deren Undifferenziertheit nicht möglich ist, legten verschiedene Autoren (9, 14) - zur Einteilung der Huminsäuren und zur Angabe des Humifizierungsgrades - empirisch eine Extinktions-Quotienten-Methode fest. In der Tabelle 1 ist die Einteilung dargestellt. Allgemein gilt: Je niedriger der Quotient (minimal 2.2o), desto höher ist der Humifizierungsgrad.

E_4/E_6 - Werte	Definition
2.20	keine Huminsäure
2.20 - 2.80	"graue Huminsäure"
ca 5.00	"braune Huminsäure"
6.00 - 8.50	Huminsäure-Vorstufen

Tabelle 1: E_4/E_6 - Werte zur Klassifizierung von Huminsäuren nach (9).

Zur Ermittlung des E_4/E_6 - Wertes wird jeweils die Extinktion einer Probe bei 465 nm und bei 665 nm gemessen. Der Quotient aus den beiden Werten $\frac{E\text{-}465}{E\text{-}665}$ ergibt den E_4/E_6 - Wert. Er ist weitgehend unabhängig von der Konzentration.

In den Tabellen 2 und 3 sind die Werte für Braunkohle-Humussäure und für Huminsäure aus Abwasser bei verschiedenen Konzentrationen angegeben. Der pH-Wert der Lösung lag jeweils zwischen 7.0 und 8.0.

Humussäure aus Braunkohle

E - nm	1×10^{-1}	2.5×10^{-2}	1×10^{-2} (mg Humussäure/ml H_2O)
E-465	0.68	0.18	0.08
E-665	0.19	0.05	0.022
E_4/E_6	3.58	3.60	3.63

Tabelle 2: E_4/E_6 - Werte von Lösungen verschiedener Konzentration von Humussäure aus Braunkohle (Roth).

Huminsäure aus Abwasser

E - nm	mg Huminsäure pro ml Wasser 0.4	0.5	0.8	1.0	2.0	4.0
E-465	0.093	0.120	0.188	0.245	0.535	0.990
E-665	0.017	0.022	0.034	0.050	0.110	0.187
E_4/E_6	5.47	5.45	5.53	4.90	4.86	5.30

Tabelle 3: E_4/E_6 - Werte von Lösungen verschiedener Konzentration der Huminsäure aus Abwasser.

Je nach Herkunft der Huminsäure variieren die Werte des E_4/E_6-Verhältnisses in einem bestimmten Bereich (9, 14).
Mit Hilfe dieser Methode und den Huminsäure-Eichkurven bei 260 nm und bei 465 nm zur Konzentrationsbestimmung (siehe II.4.5.) wurde der Anreicherungsprozeß der Huminsäure bei der Isolierung aus dem Ablauf der Kläranlage verfolgt. (siehe Tabelle 4).

E - nm	Sterilfiltrat	Ultrafiltration		Diafiltration
		Filtrat	Konzentrat	Waschwasser
E - 260	0.160	0.120	1.650	0.080
E - 465	0.018	0.014	0.113	0.010
E - 665	0.009	0.007	0.023	0.008
E_4/E_6	2.00	2.00	4.91	1.25

Tabelle 4: Kontrolle über die Anreicherung der Huminsäure bei der Aufarbeitung. Jeweils 3 ml wurden den Proben entnommen und vermessen.

4.5. Konzentrationsbestimmung von Huminsäure aus Abwasser

Neben der gravimetrischen Bestimmung der Huminsäure-Menge pro Liter Sterilfiltrat (siehe auch III.1.) wurde die Konzentration der Huminsäure auch über Eichgeraden bei 260 und 465 nm ermittelt.

Die Eichgerade bei 260 nm verläuft im Konzentrationsbereich von 0.01 bis 0.4 mg Huminsäure pro ml Wasser linear. Bei höheren

Konzentrationen wurde entweder verdünnt (Verdünnungsreihe) oder die Huminsäure-Konzentration mit der Eichgerade bei 465 nm bestimmt. Diese Eichgerade verläuft erst ab einer Konzentration von 0.2 mg Huminsäure pro ml Wasser an aufwärts linear.

	mg Huminsäure pro ml Wasser						
E - nm	0.01	0.025	0.05	0.1	0.2	0.25	0.33
E - 260	0.06	0.160	0.250	0.510	1.00	1.220	1.600
E - 465	0.01	0.018	0.018	0.018	0.044	0.056	0.074

	mg Huminsäure pro ml Wasser					
E - nm	0.4	0.5	0.8	1.0	2.0	4.0
E - 260	1.950	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
E - 465	0.093	0.120	0.188	0.245	0.535	0.990

Tabelle 5: Eichgeraden bei 260 nm und bei 465 nm zur Bestimmung der Huminsäure-Konzentration.

4.6. Komplexierte Metalle

Die Ionenaustausch-Fähigkeiten der Huminsäure und die Komplexierung von Metallen sind schon von vielen Autoren beschrieben worden (14, 108-117).

Die fehlenden Kenntnisse über die Grundstruktur des Huminsäure-Moleküls erlauben es nicht, Bindungsart und Bindungsort exakt zu ermitteln. Vermutet wird, daß die Metallkationen von Carboxyl- und NH-Gruppen chelatisiert werden (14, 109, 110).

Möglich sind auch sauerstoffhaltige, offenkettige Ligandsysteme mit komplexierenden Eigenschaften (118, 119). Im Unterschied zu den cyclischen Analoga - wie zum Beispiel Kronenäther - gibt es bei den offenkettigen Ligandsystemen keine starren Hohlräume, sondern flexiblere Pseudohohlräume, wodurch Ionenaustausch-Vorgänge rascher ablaufen können (118,120). Dies könnte eine Erklärung für die im allgemeinen schnelleren Ionenaustausch-Vorgänge bei Huminsäuren sein.

Die, wie unter III.1. beschrieben, isolierte und gereinigte Huminsäure wurde auf ihren Gehalt an Metallen untersucht. Bei den hier

durchgeführten Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob umweltrelevante Schwermetalle und die in natürlichen Gewässern vorkommenden Mineralien komplexiert werden. Im Atom-Absorptions-Spektrometer AAS 1428 der Firma Beckman wurde auf Pb und Cd, als umweltrelevante Schwermetalle und Ca, Mg, Fe und Mn als in natürlichen Gewässern vorkommende Metallkationen untersucht. Ausgegangen wurde von einer Huminsäure-Lösung der Konzentration c = 1 mg/ml.[1)]

Ergebnis:

Metall	Pb	Cd	Ca	Mg	Fe	Mn
µg pro mg HS	8.0	0.14	20.1	9.5	1.2	0.5

Tabelle 6: Ergebnisse der Atom-Absorptions-Spektrometrie. Angaben in µg Metall pro mg Huminsäure (HS).

Für jedes Metall wurde mit Hilfe einer Eichlösung das AAS justiert. Die Ergebnisse wurden durch Bezug auf Werte bekannter Konzentration berechnet (Mehrfachbestimmungen).

Von den untersuchten Metallkationen sind insgesamt pro mg Huminsäure ca. 40 µg gebunden. Das entspricht einem Gehalt an Metallen von mindestens 4 %.

Die Ergebnisse lassen nicht auf die bevorzugte Komplexierung eines bestimmten Metalls schließen, vielmehr scheinen sich die gebundenen Mengen nach der Häufigkeitsverteilung in der Umgebung des Huminsäure-Moleküls zu richten. Zum Beispiel liegt die Wasserhärte im Ablauf der Kläranlage Kirchentellinsfurt über 20° dH. Der Calcium-Gehalt ist also hoch.

Die komplexierten Schwermetalle - Blei und Cadmium - weisen auf die Umweltrelevanz der Huminsäure hin. Die toxische Wirkung dieser Metalle kann bei deren Freisetzung - zum Beispiel aus Huminsäure im Trinkwasser - zum Tragen kommen (siehe Einleitung). In der säurehydrolysierten Huminsäure (ABHA) konnten keine Metalle ermittelt werden.

---

1) Ich danke Herrn Weingärtner für die Durchführung der Messungen.

5. Kontaminations-Kontrollen

5.1. Kontrolle auf nicht gebundene Peptide und Aminosäuren

Als Vorprobe wurde ein Test auf ninhydrin-positive Substanzen im Huminsäure-Konzentrat durchgeführt.

Auf eine Kieselgelplatte der Firma Merck wurden gleiche Mengen Isoleucin, Valin, Rinderserumalbumin und Huminsäure-Konzentrat im Überschuß aufgetragen. Nach Trocknen der Flecken wurde mit Ninhydrin-Reagenz besprüht (III.2.1.).

Ergebnis:	Isoleucin	Valin	Rinderserumalbumin	Huminsäure
	positiv	positiv	positiv	negativ

Im Huminsäure-Konzentrat konnten keine ninhydrin-positiven Substanzen detektiert werden.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde untersucht, ob sich Aminosäuren oder Peptide aus dem Huminsäure-Konzentrat abtrennen lassen. Neben der Huminsäure waren einzelne Aminosäuren (Isoleucin, Valin), Rinderserumalbumin und Huminsäure zusammen mit einem Aminosäuregemisch als "internal standard" auf die DC-Platte aufgetragen (III.2.1.).

Das Ergebnis zeigt sowohl für die freien, als auch für die mit Huminsäure vermischten Aminosäuren eine normale dünnschichtchromatographische Auftrennung mit identischen R_f-Werten. Die Huminsäure selbst hatte unter den hier ausgewählten Bedingungen einen R_f-Wert von Null. Über dem Fleck mit dem reinen Huminsäure-Konzentrat zeigten sich keinerlei Hinweise auf ninhydrin-positive Substanzen oder Bestandteile. Auch der in einem Parallelversuch angewandte Chlor-o-Tolidin-Test war negativ.

Inkubation in Citrat-Puffer

Zum Nachweis auf eventuell im Huminsäure-Konzentrat vorhandene nicht gebundene Aminosäuren und Peptide wurde eine bestimmte Menge Huminsäure im Aminosäure-Analysator getestet (siehe III.3.2.). Eine Lösung der Konzentration 1 mg Huminsäure pro ml Citrat-Puffer wurde 8, 24 und 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 8,

24 und 48 Stunden wurde jeweils ein Aliquot (1 ml) in den Analysator eingespritzt.

Ergebnis: Im Aminosäurechromatogramm konnten keine ninhydrinpositiven Substanzen detektiert werden. Dicht hinter dem Ninhydrinpeak zu Beginn des Chromatogramms fand sich ein breiter Peak (Absorption bei 440 nm), der auf höhermolekulare Anteile zurückzuführen ist (121).

Indirekter Nachweis

Die Huminsäuren zeigen,unabhängig von ihrer Konzentration, immer die gleichen undifferenzierten Absorptionsspektren siehe auch Abb. 5 und 11. Nach Zusatz von freiem Protein (Rinderserumalbumin) bekannter Konzentration zum Huminsäure-Konzentrat wurden die UV-Spektren der einzelnen Substanzen und des Gemisches miteinander verglichen (siehe Abb. 6).

Bei Zusatz geringer Mengen Protein (50 µg Protein/ ml Lösung) ergeben sich aber starke Veränderungen. Das sonst undifferenzierte Spektrum steigt an zwischen 260 und 290 nm (λ_{max} = 275 nm) und ab 245 nm mit Wendepunkt bei 225 nm (Endabsorption).

Ergebnis: Wie der Vergleich der einzelnen Spektren zeigt, ist die Absorptionsdifferenzen-Kurve (ΔE= [E-Huminsäure mit Rinderserumalbumin] - [E-Huminsäure]) fast mit dem Spektrum des freien Proteins (Rinderserumalbumin) identisch. Das Ansteigen der Absorption ist auf die Anteile an aromatischen Aminosäuren im Protein zurückzuführen. Würde bei der Isolierung der Huminsäure eine Anreicherung von nicht gebundenem Protein erfolgen, so ließe sich das direkt an den Absorptionsspektren feststellen.

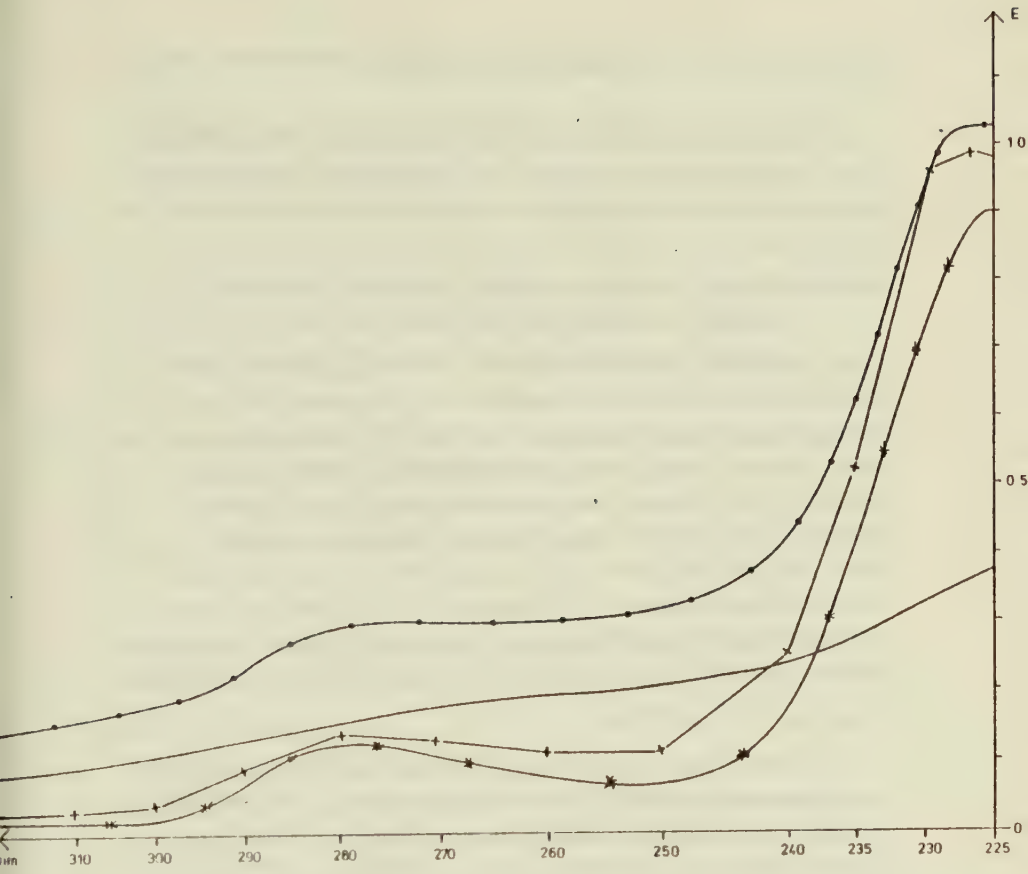


Abbildung 6: Absorptionsspektren von Huminsäure und freiem Protein.

Huminsäure und Rinderserumalbumin

Huminsäure

Rinderserumalbumin

Absorptionsdifferenzenkurve ΔE = (E-Huminsäure mit Rinderserumalbumin) - (E-Huminsäure)

Konzentration: je 50 µg/ml.

5.2. Kontrolle auf nicht gebundene Kohlenhydrate

Auf eine Kieselgelplatte der Firma Merck wurden gleiche Mengen Stärke, Glucose, Xylose, Rhamnose und Huminsäure-Konzentrat im Überschuß aufgetragen. Nach Trocknen der Flecken wurde mit Tetrazolblau besprüht (siehe III.2.2.).

Ergebnis:	Stärke	Glucose	Xylose	Rhamnose	Huminsäure
	positiv	positiv	positiv	positiv	negativ

Die Farbreaktion war beim Huminsäure-Konzentrat negativ. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde untersucht, ob sich nicht gebundene Kohlenhydrate aus dem Huminsäure-Konzentrat abtrennen lassen. Neben dem Huminsäure-Konzentrat waren Stärke, Glucose, Xylose, Rhamnose und Huminsäure gemischt mit Stärke, Glucose, Xylose, Rhamnose als "internal standard" auf die DC-Platte aufgetragen. Unter den hier angewandten Bedingungen zeigte das Huminsäure-Konzentrat einen R_f-Wert von Null. Die einzelnen Zucker und das Zuckergemisch hatten identische R_f-Werte. Über dem Huminsäure-Konzentrat war der Nachweis auf Kohlenhydrate negativ.

Inkubation in Borat-Puffer

Zum Nachweis auf eventuell im Huminsäure-Konzentrat vorhandene nicht gebundene Kohlenhydrate wurde das unhydrolysierte Huminsäure-Konzentrat im Kohlenhydratanalysator getestet (nach III.5.3.). Eine Lösung von 1 mg Huminsäure pro ml Boratpuffer (0.4 M, pH 9.3) wurde 8, 24 und 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach 8, 24 und 48 Stunden wurde jeweils ein Aliquot (je 1 ml) in den Zuckeranalysator eingespritzt.

Ergebnis: Im Zuckerchromatogramm konnten keine Kohlenhydrate detektiert werden. Nach dem Start (10 min.) fand sich ein breiter Peak, der auf höhermolekulare Anteile zurückzuführen ist (siehe auch Abb. 7).

6. Gesamt-Aminosäure-Gehalt der Huminsäure

Quantitative Aminosäure-Bestimmung nach der Alkalischen Hydrolyse

Nachdem eine Kontamination mit nicht gebundenen Aminosäuren ausgeschlossen werden konnte (siehe II.5.) war eine quantitative Bestimmung des Aminosäuregehalts sinnvoll.

Nach III.3.1. wurde die Huminsäure hydrolysiert und über eine Isoleucin-Eichkurve bei 570 nm der Gesamtgehalt an Aminosäuren bestimmt. Grundlage der Methode ist die Ninhydrin-Reaktion.

Der Extinktionswert bei 570 nm (Mittelwert aus drei Bestimmungen) ergab sich zu E_{570} = 0.15. Das entspricht einem Gesamt-Aminosäuren-Gehalt von 30.3 µg Protein pro mg Huminsäure.

Ein mg Huminsäure enthält 30.3 µg Protein.

Der Unterschied zwischen diesem Ergebnis und den Werten aus dem Aminosäure-Analysator nach saurer Hydrolyse ist auf verschieden hohe Verluste bei den einzelnen Hydrolysemethoden zurückzuführen.

Aminosäure-Analysator

Die Untersuchung des Huminsäure-Hydrolysats im Aminosäure-Analysator nach saurer Hydrolyse (III.3.2.) ergibt eine Aminosäureverteilung, die einem herkömmlichen Protein-Hydrolysat analog ist.

Tryptophan ist nicht nachzuweisen, da es sich unter den Bedinungen der sauren Hydrolyse (122) zersetzt. Ebensowenig konnten Glutamin, Asparagin und Cystein detektiert werden. Wobei das Cystein unter Umständen vollständig als Cystein-Säure vorliegen kann.

Mit dem Aminosäure-Analysator war es möglich, die Aminosäuren quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Eingespritzt wurde eine 2 mg Huminsäure entsprechende Menge des sauren Hydrolysats in Citratpuffer (pH 3.2).

Über das Autolab-System konnten die gefundenen Werte direkt zu einem gespeicherten Eich-Chromatogramm von Aminosäuren bekannter Konzentration in Beziehung gesetzt, nach ihrer Retentionszeit

identifiziert und ihre Konzentration automatisch berechnet werden (Ausdruck in nMol).

Die methodischen Verluste und die Verluste durch die Aufarbeitung (III.4.1.) wurden durch die Hydrolyse eines Proteins bekannter Konzentration und Zusammensetzung ermittelt.

Ergebnis:

Aminosäure	Konzentration in nMol
Cystein-Säure	22.3
Asparagin-Säure	38.8
Threonin	34.6
Serin	32.0
Asparagin	-
Glutamin-Säure	36.1
Prolin	16.5
Glycin	81.5
Alanin	64.2
Cystein	-
Valin	13.5
Methionin	9.1
Isoleucin	7.5
Leucin	12.5
Tyrosin	38.0
Phenylalanin	19.0
Lysin	12.2
Histidin	10.8
Arginin	3.7

Tabelle 7: Im sauren Hydrolysat der Huminsäure identifizierte Aminosäuren und deren Konzentration in nMol. Die eingespritzte Menge Hydrolysat entspricht 2 mg Huminsäure.

In der eingespritzten Menge sind insgesamt 503.0 nMol Aminosäuren enthalten. In 1 mg Huminsäure liegt der Gehalt an Aminosäuren also bei 251.5 nMol. Das entspricht einer Menge von 30.2 µg Protein in einem Milligramm Huminsäure.

Ein Milligramm Huminsäure enthält 30.2 µg Protein.

Außer den in der Tabelle angegebenen Aminosäuren wurde auch ein hoher Anteil an Ammonium-Ionen festgestellt.

Im Aminosäurechromatogramm konnten zusätzlich 7 ninhydrin-positive, atypische Aminosäure-Peaks detektiert werden. Zwei lagen im sauren und 5 im alkalischen Bereich des Chromatogramms. Die beiden ninhydrin-positiven Substanzen im sauren Bereich rühren her von der Reaktion von Kohlenhydraten mit Aminosäuren unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse (Lit. 121 und Modellhydrolyse III.4.3.). Die fünf ninhydrin-positiven Substanzen im basischen Bereich sind mit Sicherheit Bruchstücke aus dem Huminsäure-Molekül. Sie konnten weder im Elutionsdiagramm der Modellhydrolyse (II.8.3.) noch im Elutionsdiagramm von hydrolysiertem Rinderserumalbumin nachgewiesen werden.

7. Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalt der Huminsäure

Quantitative Kohlenhydratbestimmung nach der Anthron-Methode

Nachdem eine Kontamination der Huminsäure mit nicht gebundenen Kohlenhydraten ausgeschlossen werden konnte (II.5.2.), war auch die quantitative Bestimmung des Kohlenhydrat-Anteils im Huminsäure-Molekül sinnvoll.

Ober eine Glucose-Eichkurve bei 625 nm wurde der Gesamt-Kohlenhydrat-Anteil der Huminsäure ermittelt. Grundlage bildet die Anthronreaktion (siehe III.5.1.).

Der Extinktionswert bei 625 nm (Mittelwert aus drei Bestimmungen) ergab sich zu $E_{625} = 0.40$. Das entspricht nach der Eichgeraden 70 µg Kohlenhydrat pro 100 µl Huminsäurelösung.

Ein Milligramm Huminsäure enthält 70 µg Kohlenhydrat.

Die Differenz zu den Ergebnissen im Kohlenhydrat-Analysator kommt durch Hydrolyseverluste bei der Anthronmethode zustande (zum Beispiel: Bildung von Furfural).

Quantitative und qualitative Kohlenhydratanalyse

Im Kohlenhydrat-Analysator (siehe III.5.3.) wurde der Anteil der einzelnen Zucker sowie der Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalt ermittelt. Dazu wurde die Huminsäure nach den in III.5.2. angegebenen Bedingungen hydrolysiert und aufgearbeitet. Ein Aliquot des Hydrolysats wurde in den Analysator eingespritzt und die Auftrennung über einen Detektor bei 440 nm verfolgt. Die Peakfläche berechnet sich aus Höhe x Halbwertsbreit.

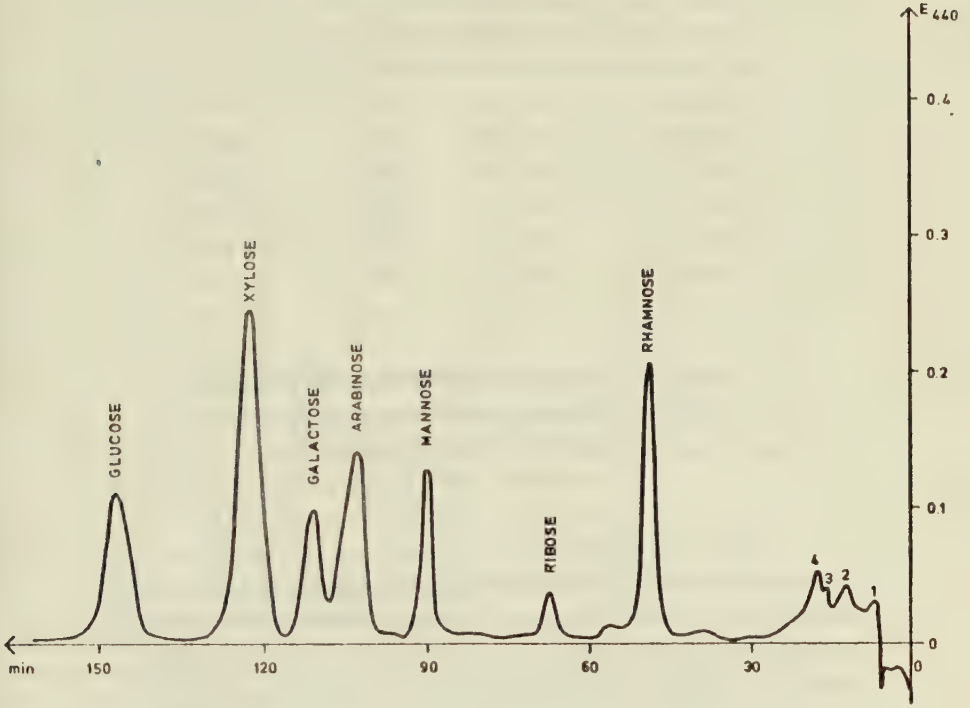


Abbildung 7: Zuckerchromatogramm des Huminsäure-Hydrolysats nach III.5.3.
1 - 4: Höhermolekulare Anteile.

Zuckerchromatogramm der Huminsäure

Zucker	Peakfläche (mm^2)
Rhamnose	130
Ribose	30
Mannose	80
Arabinose	167
Galactose	96
Xylose	281
Glucose	135

Tabelle 8: Zuckerchromatogramm der Huminsäure nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (Abb. 7). Aus 300 µl Huminsäurehydrolysat in 0.4 M Boratpuffer pH 9.3 (entsprechend 2 mg Huminsäure) wurden 200 µl eingespritzt.

Um die methodischen Verluste bei der Kohlenhydrat-Analyse weitgehendst auszuschalten wurde ein Zuckergemisch aus den im Huminsäure-Molekül identifizierten Zuckern zusammengestellt. Das Zukkergemisch bekannter Konzentration (1 mg je Zucker pro ml) war nach III.5.2. den gleichen Bedingungen ausgesetzt wie die Huminsäure und wurde ebenso aufgearbeitet und in 1 ml Boratpuffer (0.4 M, pH 9.3) aufgenommen. Davon wurden 100 µl eingespritzt, die 100 µg je Zucker entsprechen.

Eich-Chromatogramm

Zucker	Peakfläche (mm^2)	Menge (µg)
Rhamnose	880	100
Ribose	840	100
Mannose	684	100
Arabinose	1190	100
Galactose	620	100
Xylose	1190	100
Glucose	600	100

Tabelle 9: Eich-Chromatogramm des Zuckergemisches bekannter Zusammensetzung und Konzentration. Einspritzvolumen: 100 µl (entsprechend 100 µg je Zucker).

Die Peakfläche aus dem Zuckerchromatogramm des Huminsäure-Hydrolysats wurde bezogen auf die Peakfläche des Eich-Chromatogramms, die jeweils 100 µg je Zucker entsprach.

So konnte die Menge je Zucker in 200 µl Einspritzvolumen des Huminsäure-Hydrolysats berechnet werden. Damit läßt sich auch der Gehalt je Zucker pro mg Huminsäure angeben.

Zucker	Menge in 200 µl (µg)	Menge in 1 mg Huminsäure	
		(µg)	(nMol)
Rhamnose	14.8	11.1	61.0
Ribose	3.6	2.7	18.0
Mannose	11.7	8.8	48.8
Arabinose	14.1	10.6	70.6
Galactose	15.4	11.6	64.4
Xylose	23.6	17.7	117.8
Glucose	22.5	16.9	93.8

Tabelle 10: Gehalt je Zucker in 1 mg Huminsäure. Angabe in µg und in n Mol.

Mit Hilfe des Kohlenhydrat-Analysators konnte die Menge an Zukkern im Huminsäure-Molekül quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Die Ergebnisse sprechen für einen heterogenen Polysaccharidanteil, dessen Bestandteile aus den verschiedensten Glycosiden (Arabane, Xylane, Galactane) und auch aus Alkaloiden (zum Beispiel Rhamnose aus Solanin) stammen können.

Die Gesamtmenge an Kohlenhydraten beträgt hier 79.4 µg oder 474.4 n Mol Kohlenhydrat in einem Milligramm Huminsäure.

8. Abspaltung der peripheren Bausteine der Huminsäure

Zur Abspaltung der peripheren Bausteine der Huminsäure (Kohlenhydrate, Aminosäuren) muß man sich einer Methode bedienen, die drastische chemische Reaktionen ausschließt (122, 123) und eine Kontrolle über Artefaktbildung und Kontamination zuläßt (siehe II.3.).

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten:

a) eine biochemische Methode

b) eine chemische Methode

Ad a): Eine enzymatische Abspaltung durch Proteasen oder Glucosidasen scheitert sowohl an der Spezifität der Enzyme, als auch an der inhibitorischen Wirkung der Huminsäure auf das Enzym-Protein (II.2.1.). Reproduzierbare Ergebnisse wurden hierbei noch nicht erzielt.

Ad b): Eine chemische Methode muß einerseits die Abspaltung aller peripheren Bausteine gewährleisten, andererseits muß ein Angriff auf die Strukturelemente des Grundgerüstes der Huminsäure ausgeschaltet sein.

8.1. Hydrolyse mit 6 N HCl

Das Huminsäure-Konzentrat wurde nach III.4. hydrolysiert und aufgearbeitet. Die Hydrolyse wurde quantitativ verfolgt. Der absolute Verlust bei der Hydrolyse beträgt 60 % (Mehrfachbestimmung).

Der Vergleich der spektroskopischen Untersuchungen (UV, IR, Röntgenstrukturanalyse zum Beispiel) der Huminsäure vor und nach der Hydrolyse zeigt, daß keine Veränderung in der Grundstruktur festzustellen ist.

Für die Identifizierung von Strukturbausteinen aus dem Grundgerüst der Huminsäure ist die Hydrolyse allein nicht ausreichend (siehe II.2.1. Hydrolytischer Abbau).

Ein Versuch zur Fraktionierung des Grundgerüstes muß sich hier anschließen.

8.2. Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats

Mit Hilfe der Gelchromatographie gelang eine Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats in 4 Komponenten. Das Elutionsdiagramm zeigt eine Folge von vier Peaks (siehe Abb. 8). Die Elution beginnt mit der Ausschlußgrenze ($v_o = v_e = 125$ ml).

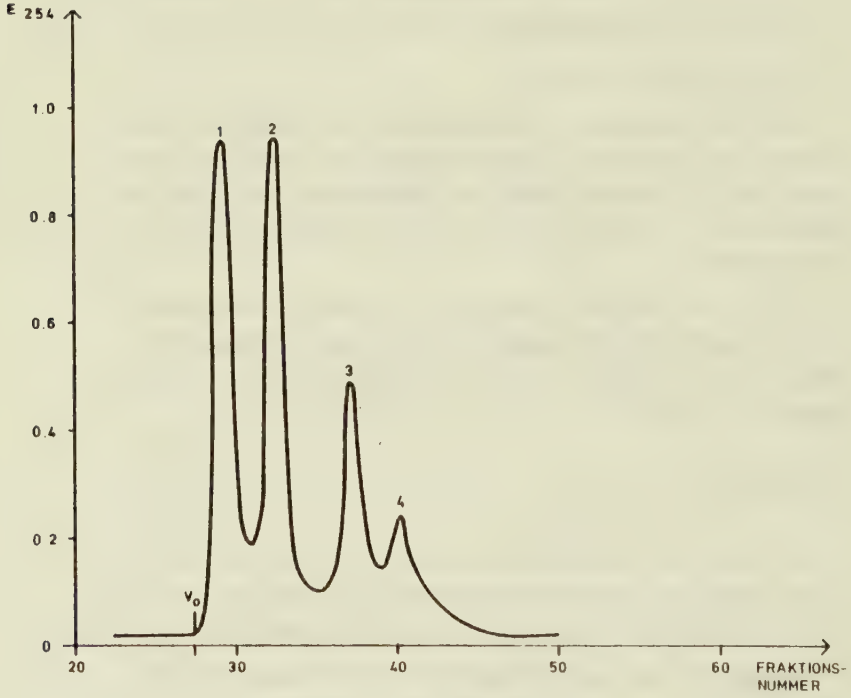


Abbildung 8: Elutionsdiagramm des Huminsäure-Hydrolysats.
Experimentelle Bedingungen siehe III.1. und 4.
$v_o = v_e = 125$ ml.

Durch wiederholte Gelchromatographie unter den gleichen Bedingungen läßt sich eine scharfe Auftrennung in die vier einzelnen Fraktionen erzielen.

Die Hydrolyse der Huminsäure mit 6 N HCl erwies sich als geeignet zur Abspaltung der peripheren Bausteine. Eine Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats in höhermolekulare Anteile gelang über die Gelchromatographie.

8.3. Modellhydrolyse

Das Verhalten von Kohlenhydraten und Aminosäuren unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse wurde in einer Modellhydrolyse untersucht.

Ein Gemisch aus den im Huminsäure-Molekül identifizierten und quantitativ bestimmten Kohlenhydraten und Aminosäuren wurde zusammengestellt (III.4.3.). Es entsprach weitgehend der natürlichen Verteilung der einzelnen Komponenten.

Von Bedeutung war die chemische Bildung höhermolekularer Substanzen unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse. Die Maillard-Reaktion (124, 125) war unter den angewandten Bedingungen ausgeschlossen.

Das Gemisch wurde nach III.4. hydrolysiert und anschließend im Aminosäure-Analysator, sowie bei der Ultrafiltration und der Gelchromatographie auf Zusammensetzung und Eigenschaften untersucht.

Aminosäure-Analysator

Ein Aliquot des in Citrat-Puffer aufgenommenen Modellhydrolysats (die 2 mg Gemisch entsprechende Menge) wurde in den Aminosäure-Analysator eingespritzt.

Das Aminosäurechromatogramm zeigte eine Aminosäureverteilung, die einem herkömmlichen Protein-Hydrolysat analog war.

Von Bedeutung sind zwei ninhydrin-positive Substanzen im sauren Bereich des Elutionsdiagramms, die mit den von Bimboes als S-1 und S-2 bezeichneten Substanzen identisch sind (121). S-1 und S-2 sind niedermolekulare Stoffe. Sie treten in sehr geringen Konzentrationen auf und lassen sich auf die Reaktion zwischen Kohlenhydraten und Aminosäuren unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse zurückführen.

Im Aminosäurechromatogramm der hydrolysierten Huminsäure sind noch fünf ninhydrin-positive, unbekannte Substanzen im basischen Bereich des Elutionsdiagramms nachzuweisen, die im Chromatogramm des Modellhydrolysats nicht ermittelt werden konnten.

Ultrafiltration

Das Modellhydrolysat wurde nach III.4.3. aufgearbeitet. Das eingeengte, getrocknete Ultrafiltrat (Waschwasser) und das Konzentrat (Oberstand) wurden mit je 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Das Huminsäure-Hydrolysat war analog behandelt worden. Die Extinktionswerte der Filtrate und Konzentrate wurden nach II.4.4.,4.5. bestimmt und verglichen.

Ergebnis:

E - nm	Modellhydrolysat		Huminsäure-Hydrolysat	
	Filtrat	Konzentrat	Filtrat	Konzentrat
260	1.600	1.700	0.580	2.000
465	0.048	0.152	0.009	0.185
665	- -	0.024	- -	0.046
E_4/E_6	- -	6.330	- -	4.020

Tabelle 11: Extinktionswerte der Ultrafiltrate und der Konzentrate vom Modellhydrolysat und vom Huminsäure-Hydrolysat bei 260, 465 und 665 nm, sowie die E_4/E_6 - Werte.

Das Konzentrat des Modellhydrolysats ist schwach gelblich. Der E_4/E_6 - Wert weist auf ein niedermolekulares Substanzgemisch hin (Humine).

Das Konzentrat des Huminsäure-Hydrolysats ist dunkelbraun. Der E_4/E_6 - Wert ist niedriger als der, der unhydrolysierten Huminsäure und ist charakteristisch für einen höheren Humifizierungsgrad.

Mit Sicherheit sind die bei der sauren Hydrolyse auf chemischem Weg entstandenen Substanzen nicht mit den Huminsäure-Fraktionen identisch.

Gelchromatographie

Die Ergebnisse der Gelchromatographie bestätigen, daß sich das Modellhydrolysat aus niedermolekularen Anteilen zusammensetzt.

Je 2 mg Modellhydrolysat und Huminsäure-Hydrolysat wurden unter gleichen Bedingungen chromatographiert (III.1.). Der Vergleich der Elutionsdiagramme zeigte erhebliche Unterschiede (siehe Abb. 8 und 9).

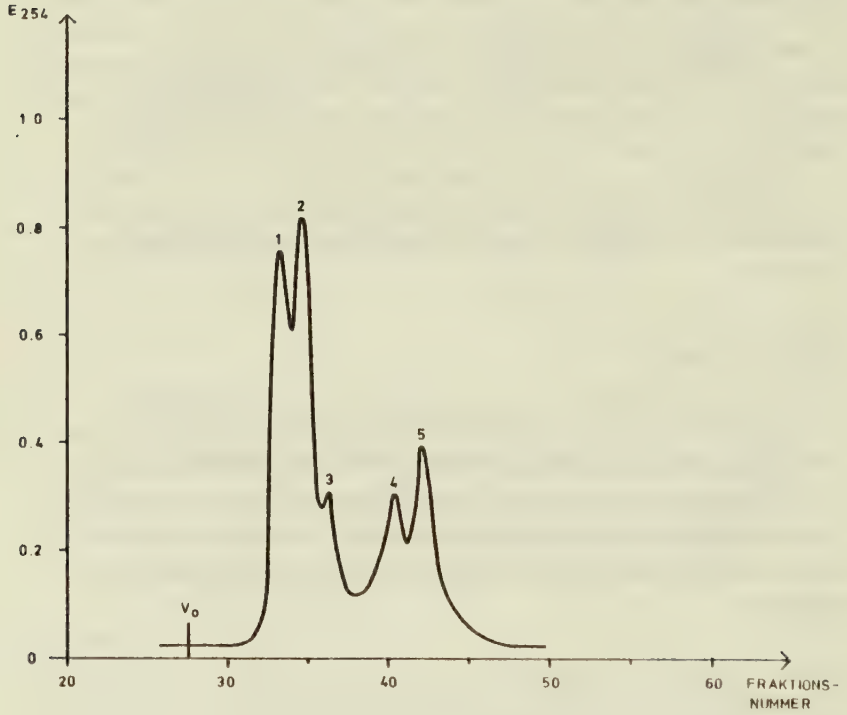


Abbildung 9: Elutionsdiagramm des Modell-Hydrolysats.
Experimentelle Bedingungen siehe III.4.3.
V_o = 125 ml, V_e = 140 ml.

Beim Huminsäure-Hydrolysat beginnt die Elution mit dem Ausschlußvolumen $v_e = v_o$ = 125 ml. Die Elution des Modellhydrolysats tritt erst ab v_e = 140 ml ein.

Die unter gleichen Bedinungen durchgeführten Trennversuche zeigten unterschiedliche Fraktionierungsmuster.

Eine Störung der Analyse der Huminsäure durch Artefaktbildung bei der sauren Hydrolyse ist somit ausgeschlossen. Der Anteil an Aminosäuren und Kohlenhydraten im Huminsäure-Molekül macht insgesamt 11 % aus.

8.4. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die säurehydrolysierte Huminsäure wurde wie unter III.4. beschrieben aufgearbeitet.

Aus einer Lösung des ultrafiltrierten Konzentrats (Konzentration: 1 mg / ml destilliertes Wasser) wurden je 5 µl in den Hochdruck-Flüssigkeits-Chormatographen eingespritzt.

Trotz der Schwierigkeiten mit der Reversed-Phase-Trennmethode und der Polarität der untersuchten Substanz (nur in Wasser löslich), zeigte sich ein guter Trenneffekt (siehe Abb. 10).

Analog der gelchromatographischen Auftrennung (Abb. 8) ergab sich eine Separierung in vier Peaks.

Die einzelnen Peaks konnten nach vollständiger Auftrennung über die Gelchromatographie als die Peaks 1 bis 4 identifiziert werden.

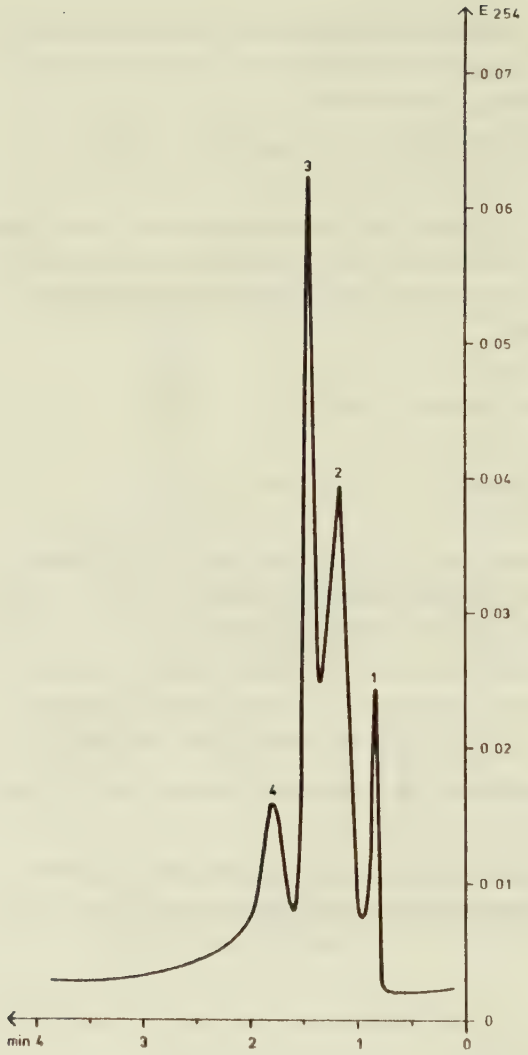


Abbildung 10: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm des Huminsäure-Hydrolysats.
Experimentelle Bedingungen siehe III.7.

8.5. UV - Spektren der hydrolysierten Huminsäure

Die Absorptionsspektren von Lösungen gleicher Konzentration (50 µg/ml) wurden verglichen.

Die Spektren von Peak 1 und 2 sowie von Peak 3 und 4 waren jeweils identisch. Es zeigt sich, daß das Spektrum von Peak 1, 2 mit dem der unhydrolysierten Probe (HS-K) und das von Peak 3, 4 mit dem der hydrolysierten, unfraktionierten Probe (ABHA) deckungsgleich ist (siehe Abb. 11). Eine Differenzierung der Spektren ist auch nach Auftrennung in die vier Fraktionen (Peak 1 - 4) nicht festzustellen. ABHA und Peak 3, 4 zeigen aber erhöhte Absorption im Bereich zwischen 250 und 280 nm und eine verstärkte Endabsorption, was auf differenzierte aromatische Strukturen hinweist (siehe auch NMR - Auswertung).

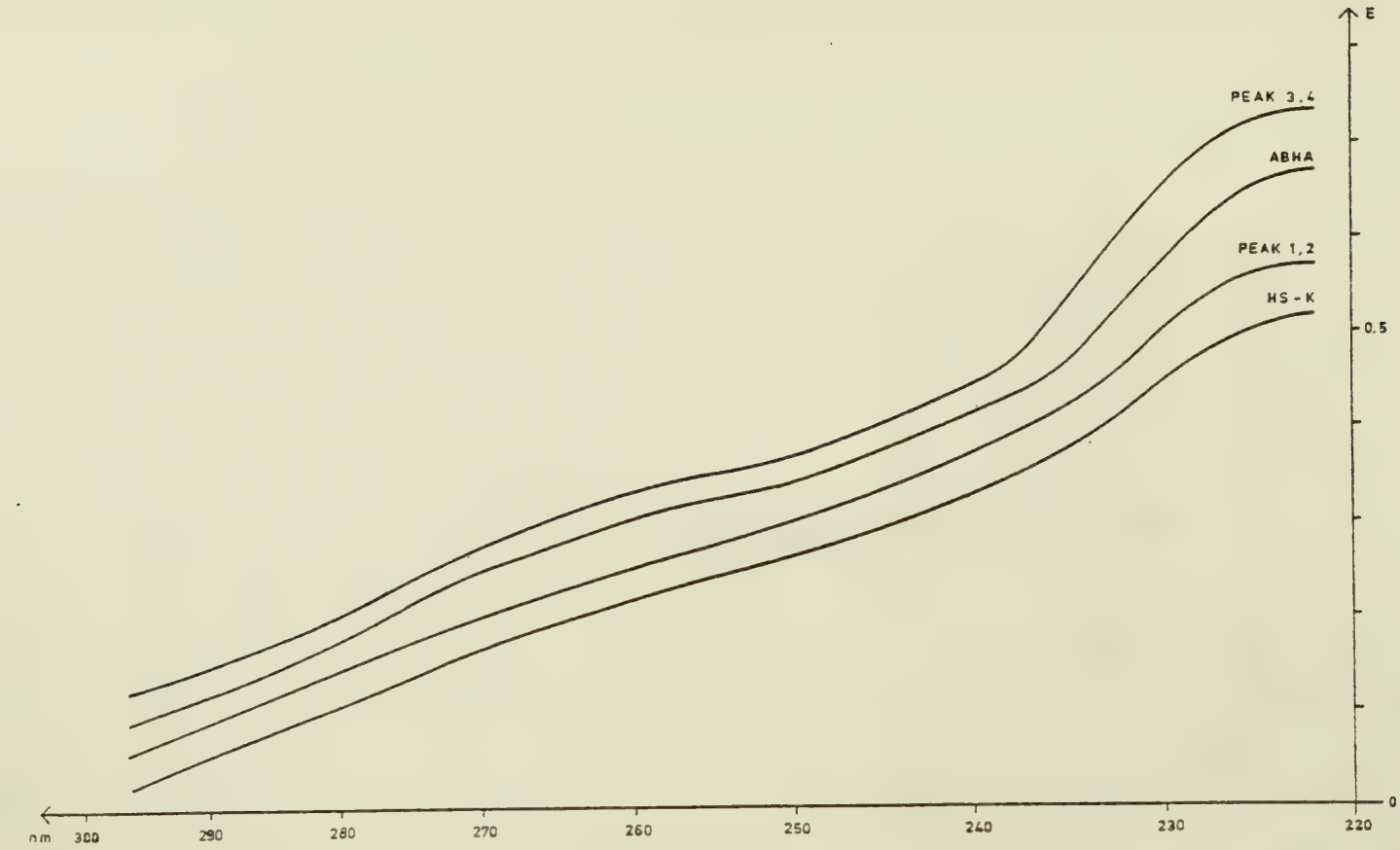


Abbildung 11: HS-K: Unhydrolysiertes Huminsäure-Konzentrat aus Abwasser. ABHA: Unfraktioniertes Hydrolysat. Peak 1-4: Fraktionen des Hydrolysats nach Gelchromatographie. Konzentration: Je 50 µg/ml.

8.6. Infrarotspektroskopie

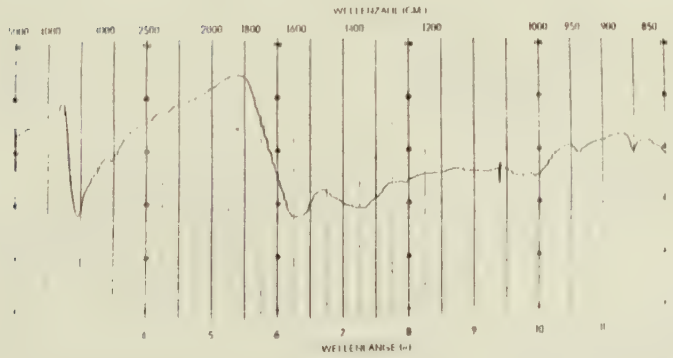
Die Proben wurden alle mit KBr verrieben und in dem IR-Spektrometer Infracord der Firma Perkin-Elmer gemessen.[1)]

Der Vergleich der IR-Spektren von Huminsäure, hydrolysierter Huminsäure (ABHA) und den einzelnen Fraktionen (zum Beispiel Peak 2) des Hydrolysats zeigt, daß keine wesentlichen Unterschiede auftreten. Das heißt, daß durch Hydrolyse und Aufarbeitung die Grundstruktur des Huminsäure-Moleküls nicht oder nur geringfügig verändert wurde (siehe Abb. 12). Die Banden im IR-Spektrum der hydrolysierten Huminsäure sind lediglich schärfer ausgeprägt, als die des unbehandelten Huminsäure-Konzentrats. Eine Differenzierung in den IR-Spektren der einzelnen Fraktionen des aufgetrennten Hydrolysats ist nicht festzustellen.

Die Spektren zeigen insgesamt eine gewisse Übereinstimmung mit den IR-Spektren von huminsäure-haltigen See- und Meeres-Sedimenten (75).

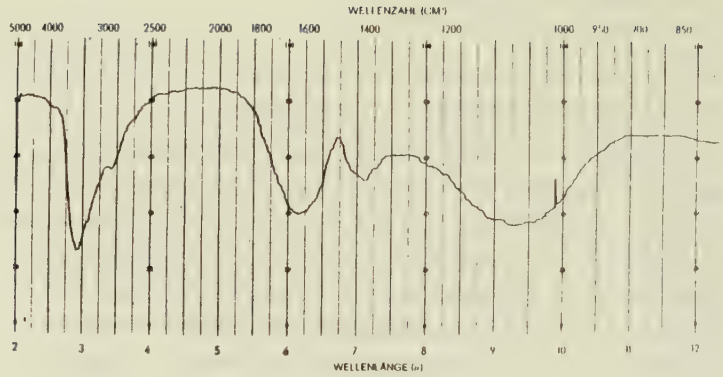
Abbildung 12: a) Humussäure aus Braunkohle (Firma Roth)
b) Huminsäure aus Abwasser unhydrolysiert
c) Huminsäure aus Abwasser hydrolysiert (ABHA)
d) Peak 2 des Hydrolysats

a)

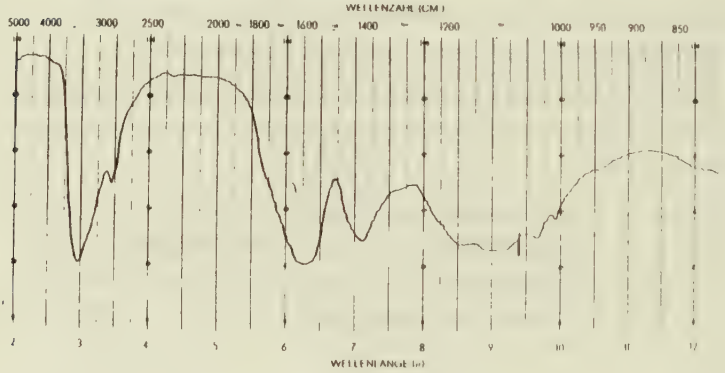


1) Ich danke Fräulein Förstel für die Durchführung der Messungen.

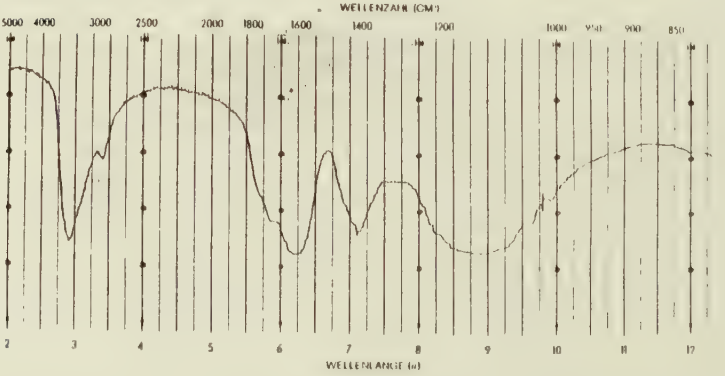
b)


WELLENZAHL (CM⁻¹)
5000 4000 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 950 900 850
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
WELLENLÄNGE (μ)

c)


WELLENZAHL (CM⁻¹)
5000 4000 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 950 900 850
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
WELLENLÄNGE (μ)

d)


WELLENZAHL (CM⁻¹)
5000 4000 3000 2500 2000 1800 1600 1400 1200 1000 950 900 850
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
WELLENLÄNGE (μ)

8.7. Röntgenstrukturanalyse

Huminsäuren liegen hauptsächlich in amorphem Zustand vor und enthalten nur geringe kristalline Anteile (126-128).

Die Interpretation der Röntgendiagramme wird eine begrenzte Aussagekraft haben und nur im Vergleich zu vorliegenden Interpretationen anderer Autoren sinnvoll sein.

Die Huminsäure aus Abwasser und die säurehydrolysierte Huminsäure (ABHA) wurden nach III.6. der Röntgenstrukturanalyse unterzogen.

Ergebnisse:

Die Aufnahmen der beiden Proben waren identisch. Es waren keine Unterschiede im Kristallisationsgrad und im Ordnungsgrad festzustellen.

Zwei scharfe Streulinien fallen auf. Eine starke bei 2.80 Å und eine mittelstarke bei 2.11 Å. Eine verwischte Streulinie zeigt sich bei 2.98 Å. Außerdem treten zwei Bereiche mit diffuser Streuung auf. Der erste von 4.53 Å bis 3.43 Å, der zweite von 2.28 Å bis 2.21 Å.

Modellsubstanz		Lignin	Huminsäure		
			Boden	Wasser	ABHA
	2.10		2.10	2.11	2.11
Aromatische				2.21	2.21 Diffus
Struktur-				2.2[illegible]	2.28 Diffus
Elemente				2.80	2.80
	3.45			3.43	3.43
	3.50		3.50		Diffus
		4.00			
Nichtaromatische	4.50			4.53	4.53
Strukturelemente			7.50		
		12.0			

Tabelle 12: Werte von Lignin, Modellsubstanz und Boden-Huminsäure nach Pollak et al. (126). Angaben in Å ($d = \frac{\lambda}{2 \sin} [Å]$)

Die Linien im Bereich 2.11, 3.43 und 4.53 Å weisen auf aromatische bzw. aliphatische Strukturelemente hin. Allerdings fehlt die Linie bei 7.5 Å vollständig. Eine Analogie zu Lignin ist nicht festzustellen. Die hier gefundenen Ergebnisse erlauben Interpretationen, die sich den Aussagen von Pollack et al. (126) anschließen.

Nach Pollack beträgt der Durchmesser des kleinsten Huminsäure-Bausteins weniger als 15 Å. Das könnte einer Struktur entsprechen, bei der ca. 3 Ringe mit zwei C-2-Ketten entlang der Achse dieses Bausteins orientiert sind. Zwischen den aromatischen Ringen können die aliphatischen Brücken liegen.

8.8. Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Pyrolyse wird oft eingesetzt zur Identifizierung von Bruchstücken nichtflüchtiger oder schwerflüchtiger organischer Komponenten wie zum Beispiel Polymeren (129-131).

Zum Verfahren

Durch Wärmeeinwirkung wird die organische Substanz in relativ niedermolekulare Bruchstücke aufgespalten, die dann auf einer Glaskapillarsäule im Gaschromatographen aufgetrennt werden. Die Kombination mit der Massenspektrometrie ermöglicht eine direkte Identifizierung der Pyrolyseprodukte.

In den Pyrogrammen ist die Relation der Peaks untereinander charakteristisch für die jeweilige Ausgangssubstanz. Zum Vergleich verschiedener Pyrogramme sind analoge Versuchsbedingungen Voraussetzung (129-131).

Die Identifizierung einzelner Bausteine aus schwerflüchtigen organischen Wasserinhaltsstoffen (132, 133) und aus Boden-Huminsäuren (134-137) ist mit Hilfe dieser Methode schon gelungen. Eine Schwierigkeit ist, daß bei den langen Pyrolysezeiten (30 sec. bei 1000° C) die Bildung von Sekundärprodukten und Artefakten nicht ausgeschlossen werden kann. Durch kurze Pyrolysezeiten (hier 1 sec.) lassen sich diese Reaktionen zurückdrängen.

Hier wurden die Pyrogramme der aus Abwasser isolierten Humin-

säure mit denen der säurehydrolysierten Huminsäure und den Fraktionen 1 und 3 verglichen. Untersucht wurde auch die Humussäure aus Braunkohle der Firma Roth.

Die Proben wurden nach III.8. pyrolysiert und im Gaschromatographen über eine Glaskapillarsäule aufgetrennt. Die intensivsten Peaks wurden anhand ihrer Massenspektren identifiziert.

Ergebnisse:

* Humussäure aus Braunkohle

Auffallend sind die aufsteigenden homologen Reihen der Alkane und Alkene, die charakteristisch sind für Huminsäuren aus Braunkohle (Steinkohlenteer): von Octan, Octen bis Nonadecan, Nonadecen waren alle Glieder der homologen Reihen vertreten.

Außerdem wurden massenspektrometrisch identifiziert:
Benzol, Toluol, Äthylbenzol, Xylole, Styrol, Trimethylbenzol, Methylstyrole, Inden, Naphthalin, Methylnaphthaline, Phenol, Dimethylnaphthalin, Kresole.

* Huminsäure aus Abwasser

Die homologen Reihen der Alkane, Alkene fehlen vollständig. Zusätzlich zu den anderen in der Humussäure identifizierten Substanzen konnten folgende Verbindungen ermittelt werden:
n-Propylbenzol, Phenylacetylen, Dimethylpyrazol, Indol, Thiophen, Indan, Inden, Dimethylstyrol, Methoxyphenol, 2-Methylpyrrol, 3-Methylinden, Acetophenon, Biphenyl, 2-Methylbiphenyl und Furanderivate z.B. Methylfuran, Furylmethylketon sowie Furfural.

Die Heterocyclen lassen sich mit Sicherheit auf Kohlenhydrat- und Proteinanteile im Huminsäure-Molekül zurückführen.

* Huminsäure-Hydrolysat (ABHA)

Auch hier fehlen die homologen Reihen der Alkane, Alkene. Die Heterocyclen sind beschränkt auf Methylpyrrol, Methylfuran und Furfural. Der Anteil der Aromaten ist mit dem der unhydrolysierten

Huminsäure identisch.

* Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats

Bei Peak 1 und Peak 3 geht der Anteil der Heterocyclen noch weiter zurück (nur Pyridin und Methylfuran). Die aromatischen Verbindungen im Pyrogramm von Peak 1 und Peak 3 entsprechen den bei der unhydrolysierten Huminsäure identifizierten Substanzen. Bei Peak 3 wurde zusätzlich noch Acenaphthen und Acenaphthylen gefunden.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist ein Unterschied zwischen der Struktur der Humussäure und der Huminsäure aus Abwasser festzustellen.

Die unter gleichen Versuchsbedingungen erzielten fast identischen Ergebnisse bei der Pyrolyse von Huminsäure, ABHA, Peak 1 und Peak 3 lassen auf ein Grundgerüst mit ähnlichen Strukturelementen schließen.

8.9. Molekulargewichts-Bestimmung

Huminsäure aus Abwasser

Das nach III.1. isolierte und gereinigte Huminsäure-Konzentrat wurde in einem Vorversuch zur Eingrenzung des Molekulargewichts auf einer UM-10-Membran (Ausschlußgrenze 10 000 dalton) der Firma Amicon getestet.

20 mg Huminsäure wurden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und in der Ultrafiltrationszelle mit 1 l destilliertem sterilfiltriertem Wasser gespült. Nach Abziehen von Filtrat und Oberstand am Rotationsverdampfer (bis zur Trockne) und anschließendem Trocknen im Exsikkator i.V. wurden die Proben ausgewogen.

Oberstand	Ultrafiltrat
5 mg	15 mg

Die Werte sind Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen. 25 % der Huminsäure werden zurückgehalten und 75 % passieren die UM-10-Membran. Der größere Anteil des Huminsäure-Konzentrats hat also ein Molekulargewicht zwischen 1000 und 10 000 dalton. Ein Teil ist höhermolekular (Molekulargewicht über 10 000 dalton). Ein einheitliches Molekulargewicht war nicht festzustellen.

Daß kein einheitliches Molekulargewicht vorliegt, sondern eine für Polymere typische Molekulargewichtsverteilung, zeigen auch die Ergebnisse der präparativen Ultrazentrifugation. Die nach III.9.1 durchgeführten Messungen ergaben keine einheitliche Sedimentation. Selbst bei der maximal zulässigen g-Zahl konnten die Sedimentationskurven mathematisch nicht ausgewertet werden.

Huminsäure-Fraktionen

Das Elutionsdiagramm der hydrolysierten Huminsäure zeigt (siehe Abb. 8), daß das Molekulargewicht von Peak 1 mit Sicherheit über 1500 dalton liegt ($v_e = v_0 = 125$ ml, bestimmt mit Rinderserumalbumin), während Peak 2, 3 und 4 bereits in den Fraktionierungsbereich des Sephadex-G-15-Gels fallen. Erhöhte aromatische Anteile (höhere Retention), Molekülform und Molekülgröße können die Frak-

tionierung beeinflussen.

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen (3 - 5 mg) war eine Molekulargewichtsbestimmung der einzelnen Fraktionen mit klassischen Methoden, wie zum Beispiel über den osmotischen Druck, nicht möglich.

Wiederholt durchgeführte Versuche zur Molekulargewichtsbestimmung mit der präparativen Ultrazentrifuge, der Massenspektrometrie sowie der Feld-Desorptions-Methode waren nur bei Peak 4 erfolgreich.

Die Ultrazentrifugationsmethode ist apparativ begrenzt (maximale g-Zahl), sodaß nur Molekulargewichte von mindestens 10 000 dalton (abhängig von der Molekülform) exakt bestimmt werden können. Wie bei den Messungen des Huminsäure-Konzentrats ist auch bei den einzelnen Fraktionen keine einheitliche Sedimentation festzustellen. Die Sedimentationskurven ergeben keine Geraden und lassen sich folglich nicht mathematisch auswerten.

Erfolgreich war die Feld-Desorptions-Methode bei der Analyse von Peak 4 (siehe Abb.13). Die mehrfach durchgeführte Messung zeigte ein reproduzierbares Ergebnis.

$M^+ = 765$ Molekulargewicht
$M^+-2 = 763$ von Peak 4

Zusammenfassend läßt sich sagen: exakt bestimmt werden konnte das Molekulargewicht von Peak 4 zu 765 dalton. Außerdem ist das Molekulargewicht von Peak 1 nach den Ergebnissen der Gelchromatographie mit Sicherheit größer als 1500 dalton, und Peak 2 und 3 liegen zwischen diesen Werten.

Molekulargewichte		
10 000 dalton $\geq$	Peak 1 >	1 500 dalton
1 500 dalton $\geq$	Peak 2 >	
	Peak 3 >	765 dalton
	Peak 4 =	765 dalton

Tabelle 13: Molekulargewicht von Peak 4 und Molekulargewichtsbereiche der übrigen Fraktionen aus dem Huminsäure-Grundgerüst.

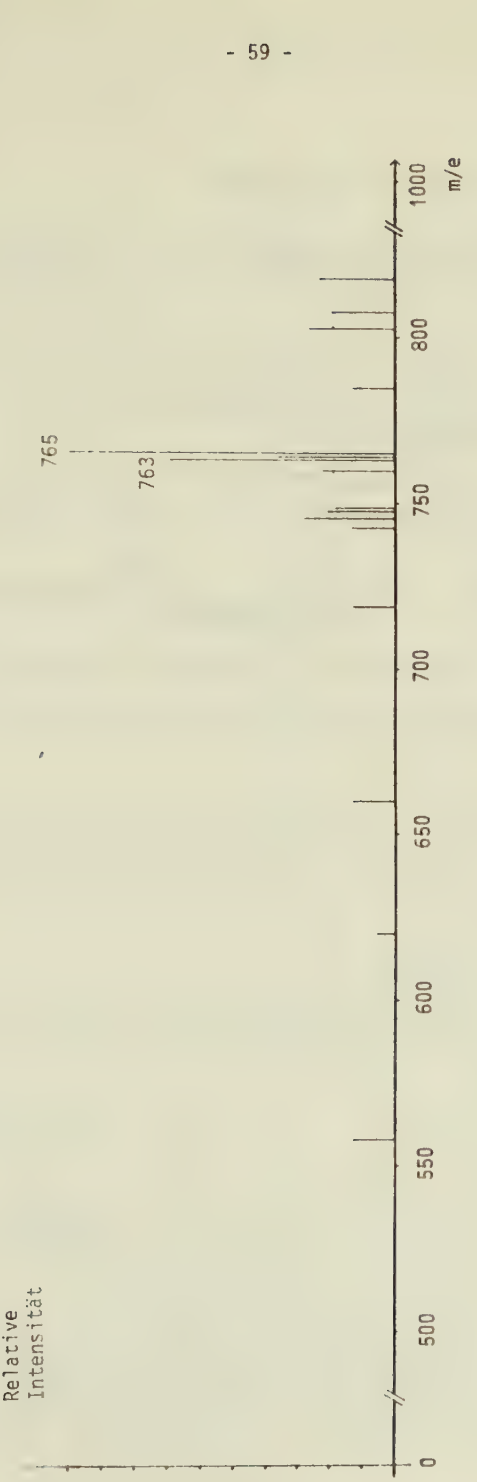


Abbildung 13: Felddesorptionsspektrum der niedermolekularsten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 4).

9. NMR - Spektroskopische Untersuchungen

Bei der Untersuchung der Huminsäure und ihrer Fraktionen waren herkömmliche Analysemethoden wie IR- und UV-Spektroskopie wenig aussagekräftig.

Zur Identifizierung von Strukturelementen aus dem Huminsäure-Grundgerüst mußten also andere Methoden herangezogen werden. Hier bot sich die NMR-Spektroskopie an.

Mit dieser Methode sind in den letzten Jahren, vor allem bei der Analyse von Naturstoffen, Erfolge erzielt worden (138, 139).

9.1. 1-H NMR-Spektren der Huminsäure

Alle Proben wurden nach III.10.1. vorbereitet und gemessen.

Das 1-H-NMR-Spektrum der Huminsäure aus Abwasser gliedert sich in drei Bereiche (siehe Abb. 14)

a) Aliphatischer Bereich

Im aliphatischen Bereich liegen bei 0.89 ppm, 1.22 ppm und 1.93 ppm die drei Hauptresonanzen. Sie sind auf einen diffusen Grundpeak aufgesetzt, der sich von 0.58 ppm bis 2.28 ppm erstreckt.

b) Hydroxymethyl Bereich

Im Hydroxymethyl Bereich tritt bei 3.69 ppm eine singuläre Resonanz auf. Auffallend ist, daß kaum Nebenresonanzen vorhanden sind.

c) Aromatischer Bereich

Der wenig strukturierte arômatische Bereich reicht von 7.33 ppm bis 7.88 ppm und zeigt keine Besonderheiten.

Das 1-H NMR-Spektrum des unfraktionierten Huminsäure-Hydrolysats (ABHA) ist fast mit obigem Spektrum identisch.

Im aliphatischen Bereich sind zwei breite Hauptresonanzen bei 0.86 ppm und 1.22 ppm festzustellen. Der gesamte Bereich erstreckt sich, ähnlich der unhydrolysierten Probe, von 0.58 ppm bis 2.38 ppm. Im Hydroxymethyl Bereich tauchen neben der Resonanz bei

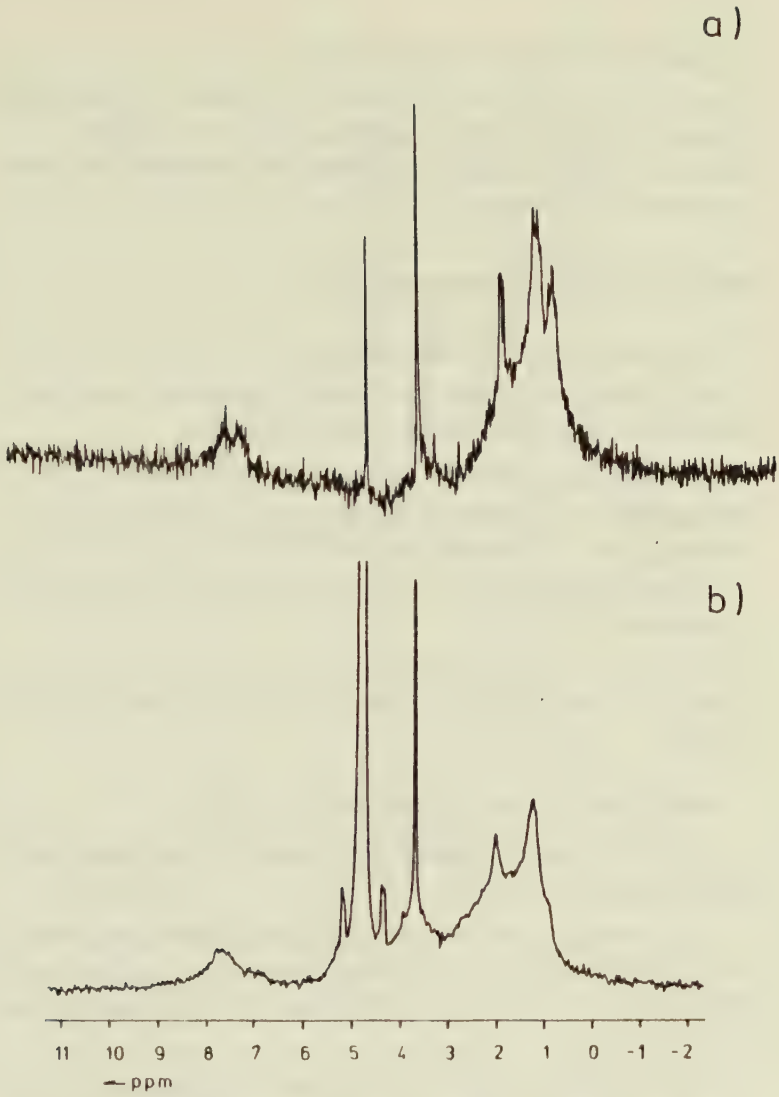


Abbildung 14 a,b: a) 1-H-NMR-Spektrum von Huminsäure aus Abwasser. Entspricht den Huminsäureproben der Kläranlagen Kirchentellinsfurt (Zulauf und Ablauf), Eutingen, Steinlach-Wiesaz und der Laborkläranlage.

b) 1-H-NMR-Spektrum der ersten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 1).

3.68 ppm keine weiteren Resonanzen auf.

Auch in dieser Probe ist der aromatische Bereich unstrukturiert. Er besteht aus einem breiten, undifferenzierten Berg, dessen Zentrum bei 7.69 ppm liegt. Die aromatischen Resonanzen absorbieren im Bereich von 7.28 ppm bis ca. 8.0 ppm.

Die Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats

* Erste Fraktion (Peak 1) siehe Abbildung 14 b.

Das 1-H NMR-Spektrum von Peak 1 zeigt keine wesentlichen Unterschiede zum unfraktionierten Huminsäure-Hydrolysat.

Der schwach strukturierte aliphatische Bereich erstreckt sich von 0.38 ppm bis 2.68 ppm und gliedert sich in zwei Hauptresonanzen, die bei 1.23 ppm und 1.99 ppm liegen.

Im Hydroxymethyl Bereich taucht nur die singuläre Resonanz bei 3.68 ppm auf.

Im aromatischen Bereich befindet sich ein breiter, unstrukturierter Peak von 6.88 ppm bis 7.88 ppm mit einem Maximum bei 7.77 ppm.

* Zweite Fraktion (Peak 2) siehe Abbildung 14 c.

Im 1-H NMR-Spektrum von Peak 2 ist insgesamt eine Zunahme der Strukturierung festzustellen.

Der aliphatische Bereich zeigt die beste Strukturierung aller Fraktionen. Er besteht aus zwei Hauptresonanzbereichen. Der erste erstreckt sich von 0.58 ppm bis 1.78 ppm, der zweite von 1.78 ppm bis 3.0 ppm.

Im Hydroxymethyl Bereich ist die singuläre Resonanz bei 3.68 ppm auf den Anstieg des gesamten aliphatischen Bereichs aufgesetzt. Der aromatische Bereich erscheint zum erstenmal strukturiert. Der stark strukturierte Bereich erstreckt sich von 7.18 ppm bis 8.18 ppm, mit einem Maximum bei 7.68 ppm. Mit größter Wahrscheinlichkeit liegt ein überlagertes AA´BB´-System vor. Die Kopplungskonstante beträgt: $J_{AB} = 8\,Hz$.

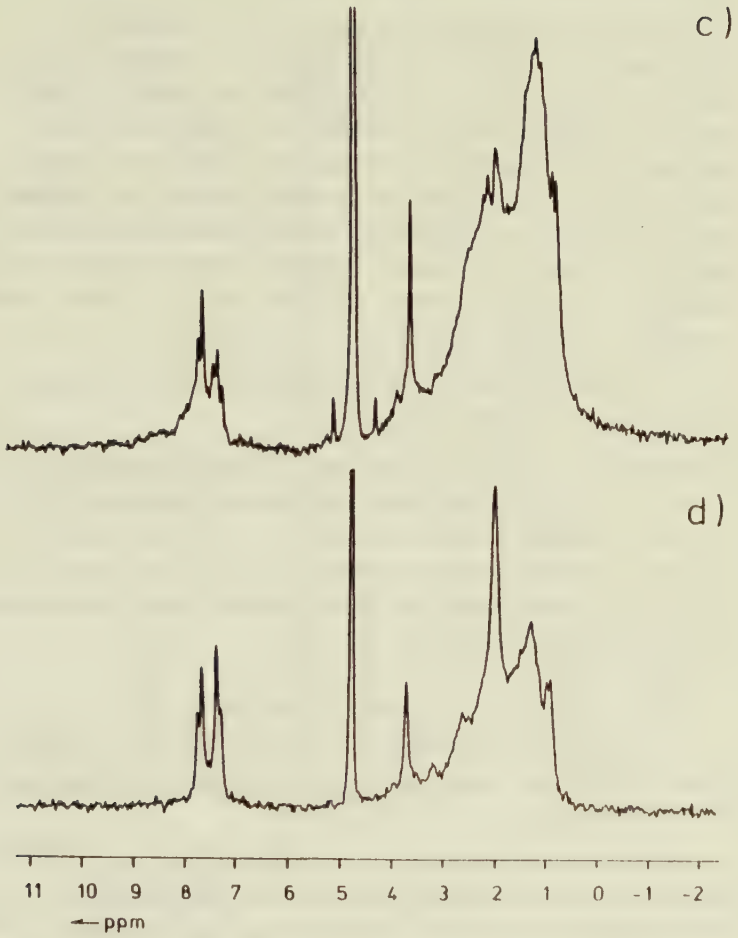


Abbildung 14 c,d: c) 1-H-NMR-Spektrum der zweiten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 2).

d) 1-H-NMR-Spektrum der dritten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 3).

* Dritte Fraktion (Peak 3) siehe Abbildung

Auch das 1-H NMR-Spektrum von Peak 3 ist gut strukturiert. Allerdings ist der aliphatische Bereich weniger strukturiert als bei Peak 2. Er besteht aus zwei Hauptbereichen, deren mittlere Grenze bei 1.68 ppm liegt. Das Maximum des aliphatischen Teils befindet sich im tieffeldverschobenen Bereich mit relativ scharfen Resonanzen. Die eventuelle singuläre Resonanz bei 1.99 ppm kann einem oftmals wiederkehrenden Strukturelement entsprechen (zum Beispiel der Methylresonanz (Acetylgruppierung) einer aliphatischen Seitenkette). Im Anstieg des Fußes liegt ein kleiner Resonanzberg bei 3.08 ppm.

Im Hydroxymethyl Bereich taucht die reine singuläre Resonanz ohne Aufsatz bei 3.68 ppm auf.

Im aromatischen Bereich handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein AA´BB´-System mit aufgesetzten Resonanzen. Die Verschiebungswerte liegen bei 7.31 ppm, 7.40 ppm, 7.68 ppm und 7.77 ppm. Die Koppllungskonstante beträgt: J_{AB} = 8Hz. Auch hier gibt es einen Hinweis auf einen strukturierten, wiederkehrenden, stark aromatischen Anteil.

* Vierte Fraktion (Peak 4) siehe Abbildung 14 e.

Im 1-H NMR-Spektrum von Peak 4 zeigt sich sowohl im aliphatischen, als auch im aromatischen Bereich eine starke Abnahme der Strukturierung.

Im aliphatischen Bereich - von 0.38 ppm bis 3.08 ppm - tritt keine weitere Feinstrukturierung auf. Die Aufspaltung in zwei Resonanzbereiche fehlt. Auf den breiten Berg sind Einzelpeaks aufgesetzt.

Im Hydroxymethyl Bereich ist keine definierte Struktur mehr festzustellen. Die singuläre Resonanz bei 3.68 ppm taucht nicht mehr auf.

Der aromatische Bereich - von 7.18 ppm bis 8.08 ppm - besteht aus überlagerten und aufgesetzten Resonanzen. Eine Strukturierung ist nicht mehr erkennbar.

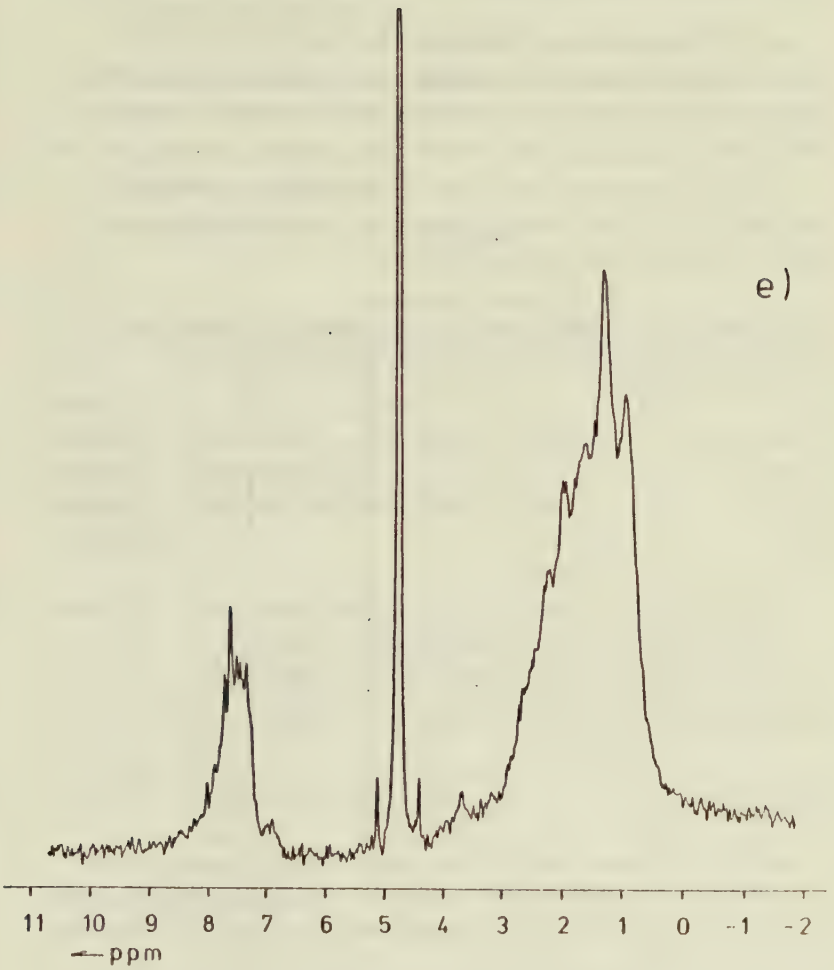


Abbildung 14 e: 1-H-NMR-Spektrum der vierten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 4).

9.1.1. Zusammenfassung

Die 1-H NMR-Spektren der Huminsäure und des unfraktionierten Huminsäure-Hydrolysats sind insgesamt wenig aussagekräftig. Ebenso lassen sich die Spektren von Peak 1 und 4 nur schwer interpretieren.

Die starke Strukturierung in den 1-H NMR-Spektren von Peak 2 und Peak 3 ist für die Identifizierung von Strukturelementen aus dem Huminsäure-Grundgerüst von Bedeutung.

Verschiebungs-	Huminsäure		Huminsäure-Fraktionen			
bereich	Konzentrat	Hydrolysat	Peak Nr.			
			1	2	3	4
Aliphatischer	0.89	0.86		0.85	0.86	
				0.93	0.93	
	1.22	1.20	1.23	1.25	1.26	
	1.93					1.94
	2.00		1.99		1.99	
				2.03		
				2.19		
					2.58	
Hydroxymethyl	3.69	3.68	3.68	3.68	3.68	
Aromatischer	7.33			7.31	7.31	
				7.40	7.40	
				7.48		
		7.69		7.68	7.68	7.66
			7.77	7.76	7.77	
	7.88					

Tabelle 14: Verschiebungswerte aus den 1-H NMR-Spektren der unhydrolysierten und der hydrolysierten Huminsäure sowie der Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats (gemessen in D_2O, Angaben in ppm). In der Tabelle sind nur die Hauptresonanzen angegeben. Der Fehlerbereich liegt bei $\pm$ 0.03 ppm. Die Verschiebungswerte lassen sich in drei Bereiche untergliedern.

9.1.2. Protonenverteilung in den 1-H NMR-Spektren der Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats

Von den unterschiedlichsten Integrationsmethoden (graphisch, planimetrisch, computer-software) erwies sich die planimetrische als die genaueste Methode. Sie lieferte bei Mehrfachbestimmungen reproduzierbare Ergebnisse.

In Tabelle 15 sind die Werte angegeben.

Bereich	Prozentualer Anteil				
	ABHA	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
Aromatischer	8.6	7.0	9.3	13.1	14.1
Hydroxymethyl	10.0	16.0	4.9	4.3	1.0
Aliphatischer	81.4	77.0	85.8	82.6	84.7

Tabelle 15: Prozentuale Verteilung der Protonen auf die drei Bereiche der 1-H NMR-Spektren des unfraktionierten Huminsäure-Hydrolysats (ABHA) und der einzelnen Fraktionen.

9.2. 13-C NMR-Spektren der Huminsäure

Die Protonen-Resonanzen liegen nur in einem Bereich von 10 ppm. Hingegen umfassen die 13-C-chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in organischen Verbindungen etwa 240 ppm.

Die 13-C-Messung zeigt also Unterschiede in der chemischen Umgebung im NMR-Spektrum wesentlich deutlicher an als die Protonenresonanz und ist daher für die Strukturaufklärung geeigneter.

Ein Nachteil ist aber, daß die natürliche Konzentration an 13-C nur 1,1 % beträgt. Für eine Messung - auch bei mehr als 10 000 Akkumulationen - sind also Mindest-Substanzmengen von ca. 50 mg erforderlich.

Bei der 13-C-Messung der Huminsäure-Fraktionen traten hier Schwierigkeiten auf:

a) wegen des relativ hohen Molekulargewichts

b) wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen (3 - 5 mg pro Fraktion).

Durch die unter III.10.2.beschriebene angewandte speziell entwickelte Meßtechnik konnten die auftauchenden Probleme jedoch erfolgreich bewältigt werden.

Das 13-C NMR-Spektrum der Huminsäure aus Abwasser ist sehr unstrukturiert und mit dem Spektrum des unfraktionierten Hydrolysats identisch (siehe Abb. 15a).Gemessen wurden jeweils 15 mg in D_2O.

Im aliphatischen Bereich ragen zwei Resonanzen bei 19.0 ppm und bei 41.8 ppm aus dem Grundrauschen heraus. Die stärkste Resonanz des Gesamtspektrums liegt im Hydroxymethyl Bereich bei 72.1 ppm. Im aromatischen Bereich tauchen nur sehr schwache, verwischte Resonanzen auf.

Die Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats

* Erste Fraktion (Peak 1) siehe Abbildung 15 b.

Im 13-C NMR-Spektrum von Peak 1 zeigt sich, gegenüber der unhydrolysierten Huminsäure und dem unfraktionierten Huminsäure-Hydrolysat, eine zusätzliche Resonanz im Carbonylbereich bei 179.4 ppm. Die stärkste Resonanz ist auch hier die im Hydroxymethyl Bereich bei 72.1 ppm. Der aromatische Bereich ist nur schwach detektierbar.

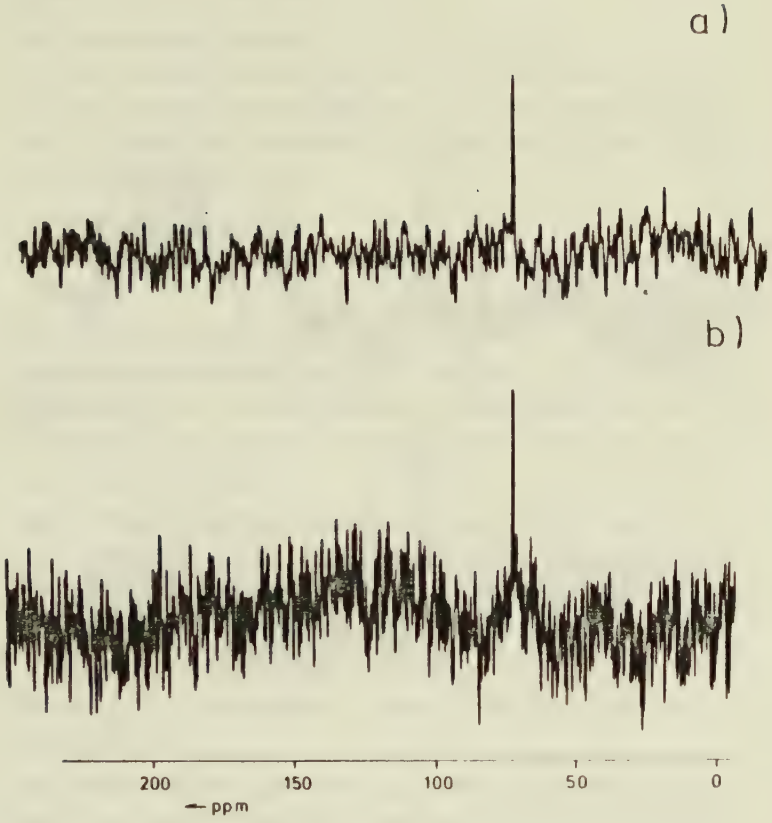


Abbildung 15 a,b: a) 13-C-NMR-Spektrum der Huminsäure aus Abwasser.
b) 13-C-NMR-Spektrum der ersten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 1).

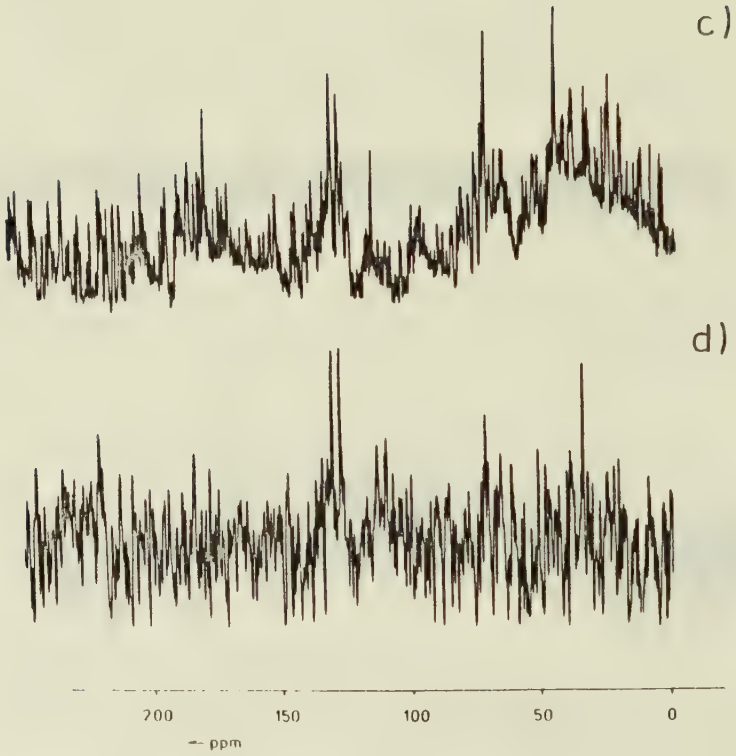


Abbildung 15 c,d: c) 13-C-NMR-Spektrum der zweiten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 2).
d) 13-C-NMR-Spektrum der dritten Fraktion des Huminsäure-Hydrolysats (Peak 3).

* Zweite Fraktion (Peak 2) siehe Abbildung 15 c.

Im 13-C NMR-Spektrum von Peak 2 ist eine starke Zunahme der Strukturierung festzustellen. Es läßt sich in vier Bereiche untergliedern (siehe Tabelle 16).

a) Aliphatischer Bereich
Im aliphatischen Bereich, der sich von 16 ppm bis 48 ppm erstreckt, treten bei 41.8 ppm und 45.3 ppm zwei Hauptresonanzen auf. Die restlichen Resonanzen sind breit überlappend und nicht sehr stark strukturiert.

b) Hydroxymethyl Bereich
Die stärkste Einzelresonanz des Gesamtspektrums liegt bei 72.0 ppm.

c) Aromatischer Bereich
Der aromatische Bereich ist stark strukturiert. Er reicht von 115 ppm bis ca. 131 ppm. Neben einer Hauptresonanz bei 115.4 ppm treten bei 128.4 ppm und bei 131.1 ppm zwei Nebenresonanzen auf.

d) Carbonyl Bereich
Der in Peak 1 bereits angedeutete Carbonyl Bereich geht hier von 170 bis 185 ppm und weist viele Einzelresonanzen auf. Bei 174.0 ppm und bei 179.4 ppm liegen zwei Hauptresonanzen.

* Dritte Fraktion (Peak 3) siehe Abbildung 15 d.

Auch das 13-C NMR-Spektrum von Peak 3 läßt sich in vier Bereiche einteilen.

Im aliphatischen Bereich, der sich von 27.1 ppm bis 44 ppm erstreckt, ist bei 35.0 ppm eine Einzelresonanz vom unstrukturierten Rest abgehoben. Im Vergleich zu Peak 2 nimmt der aliphatische Anteil ab. Auch der Hdroxymethyl Bereich nimmt im Vergleich zu Peak 2 ab. Die Hauptresonanz liegt bei 72.0 ppm. Der aromatische Bereich nimmt im Vergleich zu Peak 2 zu. Er reicht von ca. 100 ppm bis ca. 148 ppm und zeigt zwei scharfe Linien bei 128.1 ppm und bei 131.1 ppm.

Der Carbonyl Bereich ist nach tieferem Feld verschoben und nimmt, im Vergleich zu Peak 2, ebenso ab wie der aliphatische und

der Hydroxymethyl Bereich. Er liegt zwischen 180 ppm und 214 ppm. Um die Hauptresonanz bei 184.5 ppm gruppieren sich drei bis vier schwache, gleichintensive Resonanzen wie zum Beispiel die bei 180.5 ppm und bei 209.0 ppm.

* Vierte Fraktion (Peak 4)

Das 13-C NMR-Spektrum von Peak 4 ist nicht interpretierbar.

9.2.1. Zusammenfassung

In den 13-C NMR-Spektren von Peak 1 bis Peak 3 ist eine zunehmende Strukturierung eindeutig erkennbar.

Die Intensität der Hydroxymethyl-Resonanz nimmt von Peak 1 nach Peak 3 ab. Ebenso verkleinern sich der aliphatische und der Carbonyl Bereich.

Der aromatische Bereich nimmt zu. Trotz verschieden manipulierter Datensätze wurden bei allen Messungen immer wiederkehrende Resonanzwertbereiche erhalten.

Die 13-C NMR-Spektroskopie lieferte zusätzlich Informationen über den Carbonyl Bereich, der in den 1-H NMR-Spektren nicht detektierbar ist (D_2O als Lösungsmittel). Damit kann eine Aussage über eine Bindungsformdes Sauerstoffs im Grundgerüst der Huminsäure gemacht werden.

Verschiebungs-bereich	Huminsäure		Fraktionen (Peak Nr.)			
	Konzentrat	Hydrolysat	1	2	3	4
Aliphatischer Bereich	19.0	19.0				
				25.1		
				30.2		
					35.0	--
	41.8	41.8		41.8		
				45.3		
Hydroxymethyl Bereich	72.1	72.1	72.1	72.0	72.0	
					79.0	--
Aromatischer Bereich					110.5	
					114.1	
				115.4		
	--	--		128.4	128.1	--
				131.1	131.1	
					148.3	
				154.1		
Carbon-säuren				174.0		
				177.8		
	--	--	179.4	179.4	180.5	--
Carbonyl Bereich					184.5	
					209.0	
Aldeyde + Ketone	--	--		223.0	222.0	--

Tabelle 16: Verschiebungswerte aus den 13-C NMR-Spektren der unhydrolysierten Huminsäure, der hydrolysierten Huminsäure und der Fraktionen des Huminsäure-Hydrolysats (gemessen in D_2O, Angaben in ppm). In der Tabelle sind nur Hauptresonanzen verzeichnet. Der Fehlerbereich liegt bei $\pm$ 0.30 ppm. Die Verschiebungswerte lassen sich in vier Bereiche untergliedern.

9.3 Kombinationsvergleich der 1-H und 13-C NMR-Spektren von Huminsäure aus Abwasser

Von Peak 1 nach Peak 3 nimmt die Strukturierung der 1-H NMR-Spektren zu, was mit dem prozentualen Verschiebungsgang übereinstimmt (siehe Tabelle 15).

Im aliphatischen Bereich stellt man eine Intensitätsverschiebung zu Resonanzen im tieferen Feld fest. Eine Auflösung und Analyse des aliphatischen Verschiebungsbereiches ist mit den zur Verfügung stehenden NMR-Spektrometern (60 und 90 MHz) nicht möglich. Hierzu müssen weitere Untersuchungen mit Hochfeldspektrometern folgen.

Über die Feinstruktur des aliphatischen Verschiebungsbereiches kann also keine eindeutige Aussage gemacht werden. Strukturelemente, zum Beispiel aus aliphatischen Seitenketten, lassen sich nicht identifizieren.

Eine Analyse im aromatischen Bereich kann bei Peak 2 und 3 durchgeführt werden. Bei Peak 2 liegt ein überlagertes AA´BB´-System vor, das bei Peak 3 fast ausschließlich existiert. Die Kopplungskonstante beträgt in beiden Spektren J_{AB} = 8 Hz.

Die 13-C NMR-Spektren zeigen ebenfalls von Peak 1 bis Peak 3 eine zunehmende Strukturierung. Im aromatischen Bereich von Peak 2 und Peak 3 treten Resonanzen im normalen benzolischen Verschiebungsbereich auf (Hauptresonanzen bei 128.4 ppm und 131.1 ppm, siehe auch Tabelle 16). Ebenso tauchen Resonanzen im Bereich zwischen 108 ppm und 115 ppm auf, die für 13-C-Atome in ortho-Stellung zu einem mit Sauerstoff substituierten 13-C-Atom charakteristisch sind. In diesem Bereich liegen Kohlenstoffatome, die eine bestimmte Hochfeldverschiebung von O-Alkylsubstituenten in alpha-Stellung erfahren.

Durch die Kombination von 1-H und 13-C-Daten kann folgende Aussage gemacht werden:

Es liegt ein para-substituiertes, aromatisches System vor (vielleicht ein mehrmals wiederkehrendes Strukturelement aus dem Grundgerüst der Huminsäure aus Abwasser).

Die Verschiebungen von 131.1 ppm, 128.4 ppm, 115.4 ppm sowie von 154.1 ppm stimmen mit folgendem Strukturvorschlag überein:

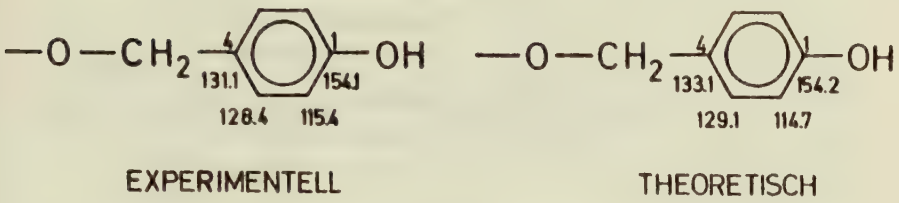


Abbildung 16.

Nachstehend sind die experimentell gefundenen Werte in einer Tabelle den theoretischen Werten gegenübergestellt.

	theoretische Werte	experimentelle Werte			
		Peak 2	Delta	Peak 3	Delta
C - 1	154.2	154.1	0.1	(148.3)	(5.9)
C - 2	114.7	115.4	0.7	114.1	0.6
C - 3	129.1	128.4	0.7	128.1	1.0
C - 4	133.1	131.1	2.0	131.1	2.0
C - 5	129.1	128.4	0.7	128.1	1.0
C - 6	114.7	115.4	0.7	114.1	0.6

Abweichungen kleiner als 1.0 ppm sind signifikant.

Tabelle 17: Die 13-C-Verschiebungswerte von Peak 2 und Peak 3 (experimentell) sind den theoretischen Werten (berechnet nach 140) gegenübergestellt. Die Werte sind in ppm angegeben.

Aufgrund der Intensität der 13-C-Resonanzen kann gefolgert werden, daß es sich bei den Resonanzen 128.4 (128.1) ppm und 131.1 ppm um sekundäre aromatische C-Atome handelt.

Diese Tatsache spricht eigentlich gegen den obigen Strukturvorschlag, da C - 4 als quartäres C-Atom keinen NOE-Effekt erfährt und ein wesentlich schwächeres Signal zeigen müßte.

Bei den betrachteten Huminsäure-Fraktionen handelt es sich nicht um eine einzelne definierte Verbindung, sondern es ist auch eine Resonanzüberlagerung verschiedener Strukturelemente wahrscheinlich.

Beispielsweise könnte die Resonanz bei 131.1 ppm auch von den O-C-Atomen aromatischer Polyäther (zum Beispiel Diphenyläther) herrühren.

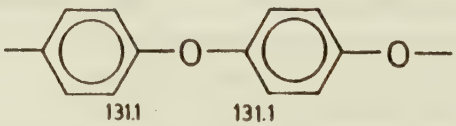


Abbildung 17.

Theoretisch	Experimentell	Delta
130.3 ppm	131.1 ppm	0.8 ppm

Tabelle 18: Verschiebungswerte von Diphenyläthern. Theoretischer Wert berechnet nach (140). Experimenteller Wert von Peak 2 und 3 aus Tabelle 16.

Der vorläufige Stand der Untersuchung läßt als Resumee folgenden Vorschlag für Strukturelemente aus dem Grundgerüst der Huminsäure aus Abwasser zu:

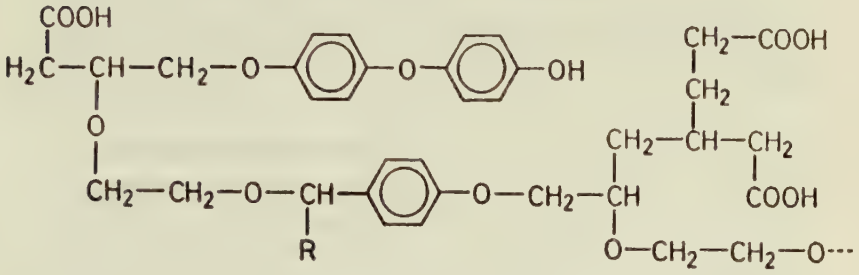


Abbildung 18: Vorschlag für Strukturelemente aus dem Grundgerüst der Huminsäure aus Abwasser.

Das Grundgerüst besteht aus linearen und verzweigten Oligo-oxyäthylenketten, die über Ätherbrücken mit para-substituierten Aromaten verbunden sind.

Diese Oligo-oxyäthylenketten können die hohe Komplexierungsrate und den hohen Sauerstoffgehalt der untersuchten Verbindungsklasse erklären.

Komplexierungsversuche mit synthetischen, sauerstoffhaltigen, offenkettigen Ligandsystemen - zum Beispiel Oligoäthylenglycoläther mit Phenoläther-Endgruppen - bestätigen das (118, 119).

Über die Struktur der aliphatischen Bestandteile kann keine definierte Aussage gemacht werden. Sicher ist, daß die aliphatischen Anteile einen hohen Verzweigungsgrad aufweisen. Alkylreste wie zum Beispiel iso-Propyl, Butyl- und iso-Butyl-Reste, können auch über Sauerstoff-Brücken mit dem Grundgerüst verknüpft sein.

Die in den 13-C-Spektren - in Übereinstimmung mit anderen Autoren - gefundenen Carbonyl-Resonanzen deuten auf das Vorhandensein von freien Carboxylgruppen hin, womit sich die Hydrophilie der Verbindung erklären läßt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheinen die Carbonsäure-Reste hauptsächlich mit den aliphatischen Seitenketten verbunden zu sein. Entsprechende Daten für aromatisch gebundene Carbonsäuren lassen sich nicht eindeutig angeben.

Anhaltspunkte für Oxymethylgruppen ergeben sich nicht. Vielmehr können die 1-H-Resonanzen im Bereich von 3.68 ppm $\pm$ 0.07 ppm durch die 13-C-Resonanzen bei 72.1 ppm als Oxyäthylen-Resonanzen identifiziert werden. Diese wesentliche Aussage läßt sich aufgrund der hier erstmals ausgiebig durchgeführten 13-C NMR-spektroskopischen Untersuchungen, im Gegensatz zu anderen Arbeiten (141-146), eindeutig machen.

Über das Sauerstoffatom gibt es normalerweise im 1-H und 13-C Spektrum keine Kopplung, denn beide $-CH_2$ -Gruppen im Polyoxyäthylen zum Beispiel haben magnetisch äquivalente Protonen. Schon bei O-CH -Gruppen müßten allerdings Kopplungen zu benachbarten Alkylgruppen auftreten. Die singuläre Resonanz im Hydroxymethyl-Bereich bei 3.68 ppm im 1-H NMR-Spektrum, bzw. bei 72.1 ppm im 13-C NMR-Spektrum kann also als $-O-CH_2$ -Resonanz identifiziert werden.

Bei den aromatischen Bausteinen aus dem Grundgerüst handelt es sich mit Sicherheit um Phenolderivate.

9.4. NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Humussäure und Ligninsulfonsäure

1-H NMR-Spektren

* Humussäure-Na-Salz der Firma Roth (aus Braunkohle)

Trotz der hier zur Verfügung stehenden großen Substanzmengen (bis zu 50 mg Huminsäure in 500 µl D_2O wurden vermessen) lieferten die NMR-Spektren keine auswertbaren Ergebnisse.

* Ligninsulfonsäure der Firma Roth

Gemessen wurden 50 mg Ligninsulfonsäure in 500 µl D_2O (siehe Abb. 19).

Aliphatischer Bereich

Der aliphatische Bereich ist stark unstrukturiert. An zwei Resonanzbereichen von 0.75 ppm bis 1.38 ppm und von 1.72 ppm bis 2.30 ppm schließt sich ein Resonanzberg an, der von 2.96 ppm bis 4.10 ppm reicht und dessen Maximum bei 3.63 ppm liegt. Das Maximum ist ein auf völlig unstrukturierte Resonanzen aufgesetzter Peak.

Aromatischer Bereich

Im aromatischen Bereich tritt ein Resonanzberg von 5.96 ppm bis 7.67 ppm auf. Das Maximum dieses unstrukturierten Resonanzberges liegt bei 6.83 ppm. Außerdem ist eine schwache singuläre Resonanz bei 8.36 ppm vorhanden.

9.4.1. Protonenverteilung im 1-H NMR-Spektrum der Ligninsulfonsäure

Von den verschiedenen Integrationsmethoden (graphisch, planimetrisch, computer-software) erwies sich die planimetrische als die genaueste. Sie ergab bei Mehrfachbestimmungen reproduzierbare Ergebnisse.

Danach beträgt der Anteil der aliphatischen Protonen 67 %. Der Anteil der aromatischen Protonen liegt bei 33 %. Das Verhältnis von aromatischen zu aliphatischen Protonen ist wie 1 zu 2.

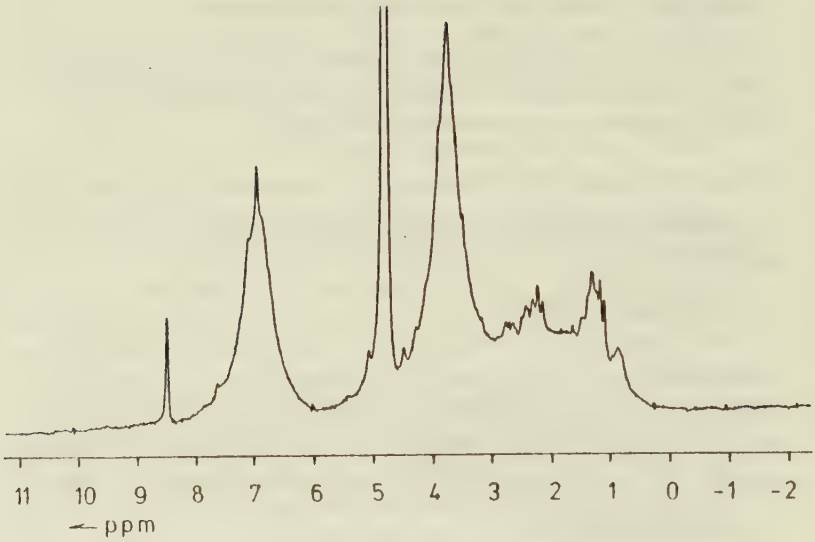


Abbildung 19: 1-H-NMR-Spektrum von Ligninsulfonsäure (Firma Roth).

13-C NMR-Spektren

Gemessen wurden jeweils 50 mg in 500 µl D_2O.

* Das 13-C NMR-Spektrum des Humussäure-Na-Salzes der Firma Roth (aus Braunkohle) läßt sich nicht interpretieren.

* Im 13-C NMR-Spektrum von Ligninsulfonsäure (Firma Roth) können vier Verschiebungsbereiche unterschieden werden.

Im aliphatischen Bereich gibt es bei 58.6 ppm und bei 65.3 ppm zwei Hauptresonanzen. Eine weitere Feinstrukturierung ist nicht festzustellen.

Der Hydroxymethyl Bereich besteht aus einem Resonanzgebirge mit Gipfel bei 73.3 ppm, eine singuläre Resonanz wie bei den Huminsäurespektren tritt nicht auf. Bei dem breiten Resonanzpeak handelt es sich um eine Superposition verschiedenster Resonanzen.

Viele Einzelresonanzen zeigen sich im aromatischen Bereich. Die Hauptresonanzen liegen hier bei 118.0 ppm und bei 150.0 ppm.

Im Carbonyl Bereich tauchen verschiedene, nach tieferem Feld verschobene Resonanzen auf. Die Hauptresonanz liegt bei 184.0 ppm.

9.4.2. Kombinationsvergleich der 1-H und 13-C NMR-Spektren von Huminsäure und Ligninsulfonsäure

Im 1-H NMR-Spektrum der Ligninsulfonsäure taucht bei 3.63 ppm eine Resonanz auf, die von Oxymethyl- oder Oxymethylen-Gruppen herrühren kann. Es liegt jedoch kein einheitlicher Ordnungsgrad vor. Im Gegensatz zu den bei der Huminsäure gefundenen Signalen im Bereich um 3.68 ppm mit einer Halbwertsbreite von nur 4 Hz, ist das Signal bei der Ligninsulfonsäure im Bereich um 3.63 ppm sehr breit (Halbwertsbreite 40 Hz). Siehe Spektren Abb. 14 und 19.

Aufschluß brachte hier die Auswertung der 13-C NMR-Spektren. Bei der Ligninsulfonsäure konnte eine Oxyäthylen-Struktur nicht identifiziert werden. Es zeigte sich keine Einzelresonanz bei 72.0 ppm, sondern bei 58.6 ppm. Dieser Verschiebungswert läßt sich eindeutig einer Oxymethylresonanz zuordnen.

Der aromatische Bereich im 13-C NMR-Spektrum der Ligninsulfonsäure zeigt bedeutend mehr Resonanzen als bei der Huminsäure aus Abwasser (der Anteil der aromatischen Protonen in den 1-H NMR-Spektren von Ligninsulfonsäure liegt auch bedeutend höher). Die Signale bei 116.8 ppm und bei 118.0 ppm weisen auf Alkyl-Aryl-Ätherstrukturen hin.

Die nach tieferem Feld verschobenen Resonanzen im Bereich von 184.0 ppm deuten auf Carbonyl-Anteile.

9.4.3. Zusammenfassung

Der Anteil an aromatischen Protonen ist bei Ligninsulfonsäure wesentlich höher (33 %) als bei Huminsäure aus Abwasser (8 - 14 %). Der Anteil aliphatischer Protonen liegt bei Ligninsulfonsäure entsprechend niedriger (67 %) als bei der Huminsäure (im Durchschnitt bei 82 %).

Bei der Ligninsulfonsäure läßt sich eindeutig der Nachweis auf vorhandene Oxymethyl-Gruppen führen, die bei der Huminsäure nicht nachzuweisen sind.

Die Strukturelemente im aromatischen Bereich sind bei Ligninsulfonsäure und Huminsäure zum Teil ähnlich. Der Vergleich zeigt aber, daß die Strukturelemente in verschiedene Grundgerüste eingebaut sind.

9.5. NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Modellsubstanzen

Um weitere Aufschlüsse über die Verknüpfung der einzelnen Strukturelemente im Huminsäure-Molekül zu bekommen, wurde eine Reihe von Modellsubstanzen vermessen.

9.5.1. 1-H NMR-Spektren von Modellsubstanzen

Prof. Dr. H.H. Nimz (Polymer-Institut der Universität Karlsruhe) stellte freundlicherweise zwei Lignindimere, das Pinoresinol und den Dehydrodiconiferylalkohol, zur Verfügung.[1)]

Außerdem wurden zwei Glycerinderivate, das 1-(3,4-Dimethoxyphenyl) -2- (2-methoxyphenoxy) -propan -1,3- diol und das Lecithin in der Spektrenauswertung mit den Ergebnissen der Huminsäure-Messungen verglichen. Zur Bestätigung der gefundenen Oxyäthylenbausteine wurden zwei Modellsubstanzen synthetisiert (siehe III.11.) und vermessen. 4-Methoxybenzylbromid und p-Brommethylbenzoesäurechlorid wurden an PEG-3000 gebunden.

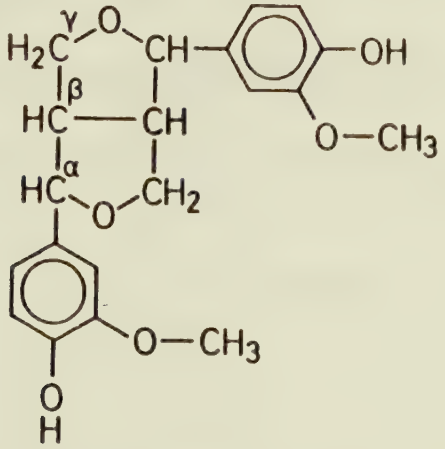


Abbildung 20: Pinoresinol

1) Ich danke Herrn Prof. Dr. H.H. Nimz für die Übersendung der Substanzen.

* Pinoresinol (50 mg in $CDCl_3$, 5 % TMS)

Der aliphatische Bereich zeigt eine starke Aufspaltung. Die 3-Methoxygruppe liegt bei 3.91 ppm. Das Duplett von H-α taucht bei 4.74 ppm auf. Die Kopplungskonstante beträgt $J_{\alpha\beta}$ = 4.7 Hz. Die Resonanz bei 3.12 ppm ist dem Multiplett von H-β zuzuordnen. H-γ-axial zeigt eine Resonanz bei 3.85 ppm und die Kopplungskonstanten J_{γ}ae = 9.23 Hz und $J_{\gamma\beta}$ a = 3.80 Hz. H-equatorial erscheint bei 4.24 ppm mit den Kopplungskonstanten J_{γ} ae =9.23 Hz und $J_{\beta\gamma}$ e = 7.0 Hz. Die Resonanz des phenolischen -OH taucht bei 5.61 ppm auf.

Im aromatischen Bereich treten mehrere Resonanzen um 6.8 ppm auf.

* Dehydrodiconiferylalkohol (50 mg in $CDCl_3$, 5 % TMS)

Die 3-Methoxygruppe zeigt eine Verschiebung von 3.91 ppm, dazu hochfeldverschoben liegt bei 3.87 ppm die 3´-Methoxygruppe.

H-α: spaltet auf in ein Duplett bei 5.46 ppm mit einer Kopplungskonstanten $J_{\alpha\beta}$ von 6.7 Hz.

H-β: hier liegt ein Multiplett bei 3.55 ppm vor.

H-γ: zeigt ein Duplett bei 2.90 ppm und eine Kopplungskonstante von $J_{\gamma\beta}$ = 6.7 Hz.

H-α´ und H-β´ zeigen beide unstrukturierte Multipletts im Bereich von 6.3 bis 6.5 ppm bzw. von 6.1 bis 6.3 ppm.

Das phenolische -OH hat einen Verschiebungswert von 5.62 ppm (ähnlich Pinoresinol). Im aromatischen Bereich taucht eine singuläre Resonanz bei 6.90 ppm auf.

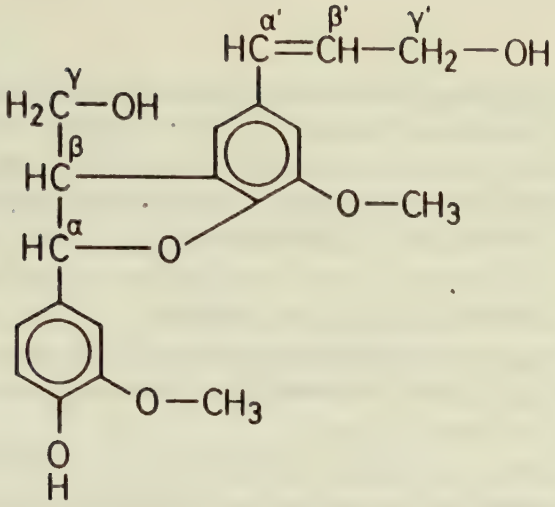


Abbildung 21: Dehydrodiconiferylalkohol

* 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol

Die hier dargestellten Werte wurden der Arbeit von Ludwig et al. (147) entnommen.

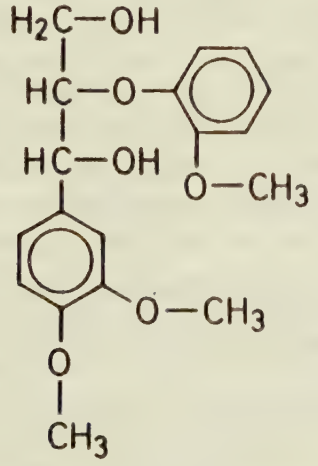


Abbildung 22: 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol

H-α: spaltet auf in ein Multiplett mit der Resonanz bei 4.97 ppm. Auf die Multiplett-Aufspaltung der H-β (4.07 ppm) und der H-γ (3.56 ppm) sind die Resonanzen der 3,4-Methoxygruppen bei 3.82 ppm und der 2´-Methoxygruppe bei 3.78 ppm sowie die Resonanzen der α,γ OH-Gruppen bei 3.56 ppm aufgesetzt.

Der aufgesetzte, breite aromatische Verschiebungsbereich zeigt zwei Zentren bei 6.94 ppm und 6.83 ppm.

Diese Verbindung wurde wegen ihrer Glycerin-Grundstruktur als Vergleichssubstanz ausgewählt. Das Spektrum zeigt keine Parallelen zum Huminsäure-Spektrum.

Auffälliges Charakteristikum der drei Spektren ist, daß die Intensitäten der α,β,γ- und vinylischen Protonen schwach sind. Dagegen ragen die Resonanzen der Methoxygruppen und des Aromaten heraus. Bei komplexerem Molekülaufbau werden nur die Methoxygruppen und der aromatische Verschiebungsbereich detektierbar sein (siehe zum Beispiel die Abbildung des 1-H NMR-Spektrums der Ligninsulfonsäure S. 80). Im Vergleich zum Huminsäurespektrum ist festzustellen, daß primär die Resonanz bei 3.55 ppm den gleichen Verschiebungsbereich aufweist, jedoch ein Multiplett darstellt und keine scharfe singuläre Resonanz.

* Lecithin aus Eigelb (50 mg in $CDCl_3$, 5 % TMS)

Auch das Lecithin (Glycerinderivat) wurde wegen seines Glycerinanteils vermessen um Aussagen über ähnliche Strukturelemente im Huminsäure-Molekül machen zu können.

Das 1-H NMR-Spektrum zeigt, daß die intensivsten Banden im aliphatischen Bereich liegen (1.25 ppm, 3.36 ppm und 3.89 ppm). Parallelen zu den Verschiebungsbereichen der Huminsäure und deren Fraktionen waren nicht feststellbar.

* p-Methoxybenzyl-PEG-3000 (50 mg in D_2O) siehe Abb. 23.

Diese Modellsubstanz hat wegen ihrer großen Ähnlichkeit mit den bereits gefundenen Strukturelementen aus dem Huminsäure-Grundgerüst besondere Bedeutung. Ein Nachteil ist, daß es aus synthese-technischen Gründen nicht möglich war, eine freie OH-Gruppe in para-Stellung zu erhalten.

Das 1-H NMR-Spektrum besteht aus einem aliphatischen und einem aromatischen Verschiebungsbereich.

Der aliphatische Bereich zeigt bei 3.66 ppm eine herausragende Resonanz, die dem PEG zuzuordnen ist. Die Methoxygruppe hat einen Verschiebungswert von 3.81 ppm und die Resonanz der Methylengruppe liegt bei 4.48 ppm.

Im aromatischen Bereich sind die Verschiebungswerte von 6.93 ppm, 7.01 ppm, 7.29 ppm und von 7.39 ppm dem vorliegenden AA´BB´-System zuzuordnen. Die Kopplungskonstante J_{AB} beträgt 8.2 Hz.

* p-Methoxybenzylalkohol (50 mg in $CDCl_3$)

Im aliphatischen Bereich taucht neben der Resonanz der Methoxygruppe bei 3.71 ppm, bei 4.45 ppm der Verschiebungswert der Methylengruppe auf. Die Resonanz der OH-Gruppe liegt bei 3.31 ppm. Die Resonanzen des AA´BB´-Systems kommen im aromatischen Bereich bei 6.75 ppm, 6.85 ppm, 7.14 ppm und 7.23 ppm. Die Kopplungskonstante hat den Wert J_{AB} = 8.5 Hz.

Im Vergleich zu den Verschiebungswerten des freien p-Methoxybenzylalkohols (in $CDCl_3$) ist bei p-Methoxybenzyl-PEG-3000, durch die Bindung an das PEG-3000 und durch den Lösungsmitteleinfluß, eine Verschiebung nach tieferem Feld zu beobachten.

* p-Brom-methylbenzoesäure-PEG-3000-Ester (50 mg in D_2O)

Die Verbindung wurde untersucht um den Einfluß einer direkt an den Aromaten gebundenen Carbonsäuregruppe auf die Verschiebungswerte zu ermitteln.

Außerdem war die Resonanz des gebundenen PEG von Bedeutung.

Im aliphatischen Bereich des 1-H NMR-Spektrums tritt eine singuläre, herausragende Resonanz bei 3.68 ppm auf, die dem PEG zuzuordnen ist. Die Methylengruppe zeigt eine Verschiebung von 4.47 ppm. Im aromatischen Bereich liegen die Verschiebungswerte des AA´BB´-Systems bei 7.48 ppm, 7.57 ppm, 7.93 ppm und bei 8.02 ppm. Die Kopplungskonstante beträgt J_{AB} = 8 Hz.

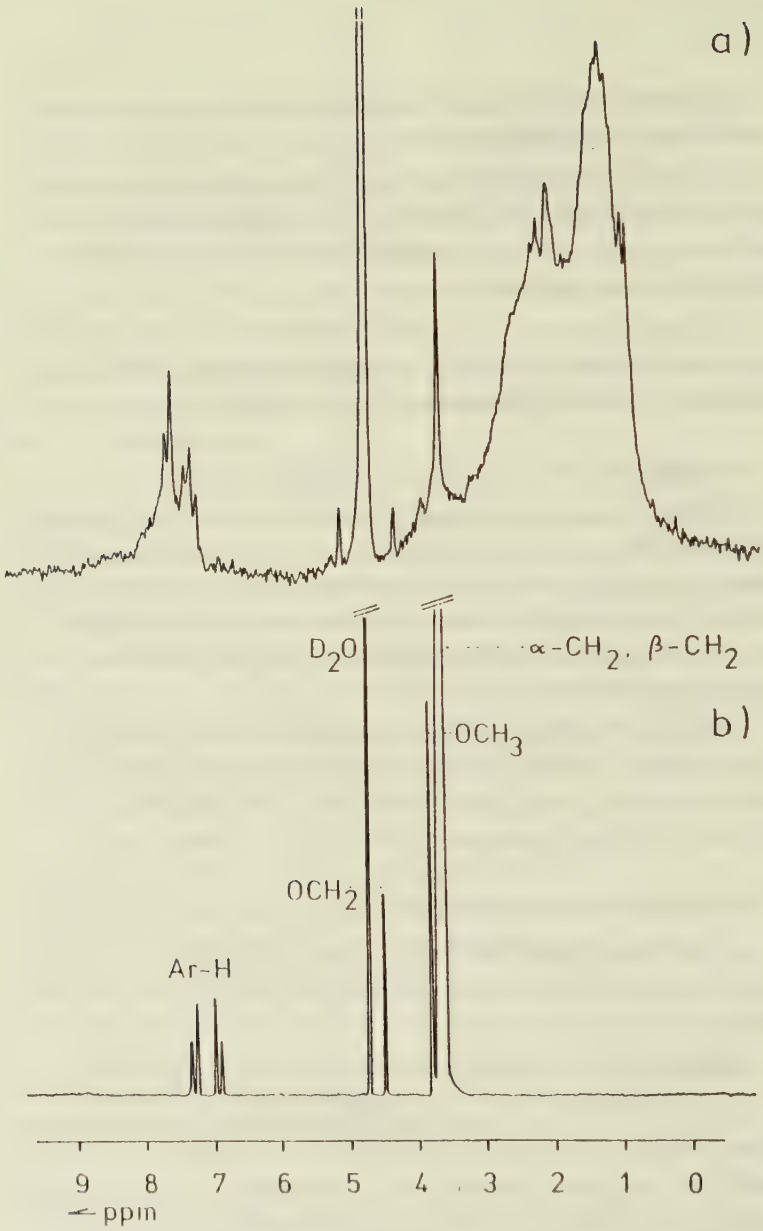


Abbildung 23: Vergleich der 1-H-NMR-Spektren von Peak 2 (a) und p-Methoxybenzyl-PEG-3000 (b).

* p-Brom-methylbenzoesäurechlorid (50 mg in $CDCl_3$)

Im aliphatischen Bereich taucht bei 4.50 ppm die Resonanz der Methylengruppe auf.

Im aromatischen Bereich zeigt das AA´BB´-System Verschiebungswerte bei 7.47 ppm, 7.57 ppm, 8.03 ppm und bei 8.13 ppm. Die Kopplungskonstante hat den Wert J_{AB} = 8.5 Hz.

Der Einfluß der Carbonylgruppe bewirkt im aromatischen Bereich allgemein eine Verschiebung der Resonanzen nach tieferem Feld. Der Verschiebungswert des gebundenen PEG ergibt sich zu 3.68 ppm. Der Vergleich der Resonanzen des freien p-Brom-methylbenzoesäurechlorids mit den Verschiebungswerten der mit PEG-3000 veresterten Verbindung zeigt, daß das gebundene PEG in einigen Fällen eine Verschiebung nach hohem Feld bewirkt.

Zusammenfassung

Eine Obereinstimmung der singulären Resonanz bei 3.68 ppm aus den 1-H NMR-Spektren der Huminsäure mit den Protonendaten bekannter Verbindungen - wie der Ligninsulfonsäure, der Lignindimere oder der Glycerinderivate wie Lecithin und anderer analoger Verbindungen - konnte nicht festgestellt werden.

Eine Ausnahme bilden hier die an PEG gebundenen Modellsubstanzen. Bei ihnen stimmt der Verschiebungswert exakt überein (3.68 bzw. 3.66 ppm) und im Vergleich zu Peak 3 des Huminsäure-Hydrolysats ist der aromatische Bereich insgesamt nach tieferem Feld verschoben. Die Verschiebungsdifferenzen, sowie die Kopplungskonstanten sind jedoch betragsmäßig gleich.

Der Unterschied in der chemischen Verschiebung läßt sich durch Anisotropie-Effekte erklären, die sich aus der Molekülstruktur ergeben können. Die Anisotropie-Effekte werden entweder durch aromatische oder aliphatische Anteile hervorgerufen, was wiederum für eine geordnete Struktur innerhalb kleiner Bausteine spricht.

Es wäre vor allem eine definierte, spezifische räumliche Lage der aromatischen Anteile denkbar.

Auf die Diskussion der aliphatischen Resonanzen in den NMR-Spektren der Huminsäure im Vergleich zu den aliphatischen Anteilen

in den NMR-Spektren der Modellsubstanzen wird in dieser Arbeit nicht eingegangen. Hierzu sind weitere Untersuchungen mit Hilfe von Hochfeldspektrometern geplant.

9.5.2. 13-C NMR-Spektren von Modellsubstanzen

13-C NMR-Spektren von monomeren und dimeren 4-Hydroxyalkylbenzolderivaten (Ligninbausteinen) wurden von Lüdemann und Nimz (148, 149) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen von Pinoresinol, Dehydrodiconiferylalkohol und 1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol (Formeln siehe Abb. 20 bis 22) wurden diesen Arbeiten entnommen.

Weder die 13-C-chemischen Verschiebungen der aromatischen Kohlenstoffatome noch die chemischen Verschiebungen der aliphatischen Kohlenstoffatome der Methylen- und Methoxygruppen oder der Propandiolderivate (Glycerinderivate) zeigen eine Übereinstimmung mit den Verschiebungswerten der Huminsäurefraktionen.

Stellvertretend sei hier der Dehydrodiconiferylalkohol dargestellt.

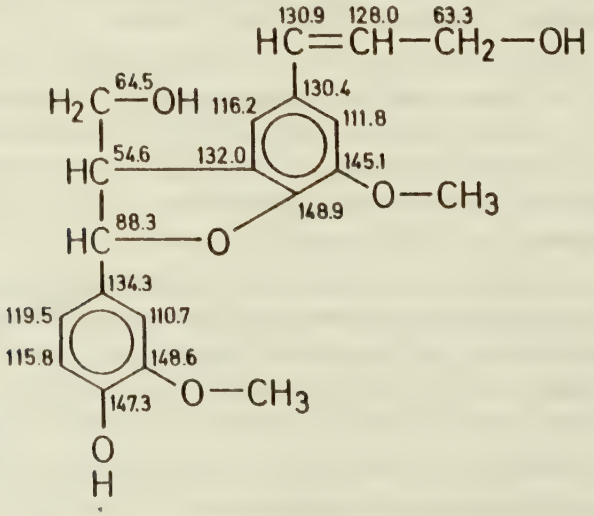
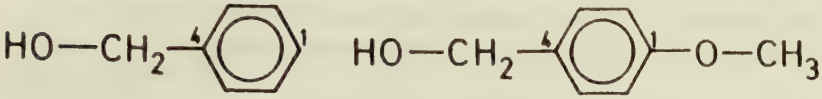


Abbildung 24: 13-C-chemische Verschiebungen von Dehydrodiconiferylalkohol nach (148, 149).

Entscheidend für die Identifizierung von Strukturelementen aus dem Grundgerüst der Huminsäure ist die 13-C NMR-spektroskopische Analyse der freien und an PEG gebundenen Modellsubstanzen.

Ausgehend vom Benzylalkohol bzw. vom Anisylalkohol (p-Methoxybenzylalkohol) kann man nach dem Inkrementsystem von Stothers (140) folgende Werte ermitteln:



	Benzylalkohol	Anisylalkohol	Delta
C - 1	127.3	157.5	30.2
C - 2	127.3	111.8	15.5
C - 3	127.3	127.3	0
C - 4	141.0	132.1	8.9
C - 5	127.3	127.3	0
C - 6	127.3	111.8	15.5

Tabelle 19: Theoretisch berechnete Verschiebungswerte der aromatischen C-Atome von Benzylalkohol und Anisylalkohol in ppm.

Experimentell ergeben sich für den Anisylalkohol folgende Daten:

	Anisylalkohol		
	Theoretisch	Experimentell	Delta
C - 1	157.5	159.0	1.5
C - 2	111.8	113.9	2.1
C - 3	127.3	128.6	1.3
C - 4	132.1	133.5	1.4
C - 5	127.3	128.6	1.3
C - 6	111.8	113.9	2.1

Tabelle 20: Gemessen wurde eine ca. 1 molare Lösung von Anisylalkohol in $CDCl_3$ (5 % TMS). Die Verschiebungswerte sind in ppm angegeben.

Die Veresterung von p-Methoxybenzylbromid mit dem PEG-3000 (siehe Experimenteller Teil 11.) zeigt den Einfluß von PEG auf die Verschiebungswerte. Außerdem ist eine Lösungsmittelabhängigkeit festzustellen.

Die experimentellen Daten des Anisylalkohols wurden mit den Meßwerten von p-Methoxybenzyl-PEG-3000 verglichen. Von beiden Verbindungen wurden jeweils 1 molare Lösungen in $CDCl_3$ (5 % TMS) vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

	Anisylalkohol	Anisyl-PEG-3000	Delta
C - 1	159.0	159.3	0.3
C - 2	113.9	113.9	0
C - 3	128.6	129.4	0.8
C - 4	133.5	130.5	3.0
C - 5	128.6	129.4	- 0.8
C - 6	113.9	113.9	0

Tabelle 21: Die 13-C-chemischen Verschiebungen der aromatischen Kohlenstoffatome des Anisylalkohols und des p-Methoxybenzyl-PEG-3000. Die Verschiebungswerte sind in ppm angegeben.

In der folgenden Tabelle 22 ist der Einfluß des Lösungsmittels auf die Verschiebungswerte von p-Methoxybenzyl-PEG-3000 aufgeführt. Gemessen wurde jeweils eine 1 molare Lösung in D_2O und in $CDCl_3$.

	Lösungsmittel		
	$CDCl_3$	D_2O	Delta
C - 1	159.3	161.3	2.0
C - 2	113.9	116.5	2.6
C - 3	129.4	132.7	3.3
C - 4	130.5	132.4	1.9
C - 5	129.4	132.7	3.3
C - 6	113.9	116.5	2.6
PEG-Bande	70.6	72.0	1.4

Tabelle 22: Die Verschiebungswerte von p-Methoxybenzyl-PEG-3000 im Lösungsmittel $CDCl_3$ (5 % TMS) und im Lösungsmittel D_2O sind einander gegenübergestellt. Die Werte sind in ppm angegeben.

Wie die Ergebnisse zeigen, sind die Resonanzen in D_2O gegenüber den Resonanzen in $CDCl_3$ alle nach tieferem Feld verschoben. Das bedeutet, daß die in anderen Lösungsmitteln als in D_2O gemessenen Verschiebungswerte nicht unmittelbar mit den Resonanzen der Huminsäurefraktionen verglichen werden können.

Zum Beispiel: Messung einer 1 molaren Lösung von 3,5-Ditertiärbutylbenzylmethyläther in $CDCl_3$ (5 % TMS).[1)] siehe nächste Seite

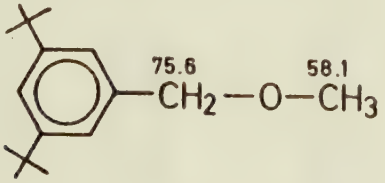


Abbildung 25: 13-C-chemische Verschiebungen der aliphatischen Kohlenstoffatome von 3,5-Ditertiärbutylbenzylmethyläther in ppm.

Gleiches gilt für die 13-C NMR-Messung einer 1 molaren Lösung von Phenyläthylmethyläther in $CDCl_3$ (5 % TMS).[1)]

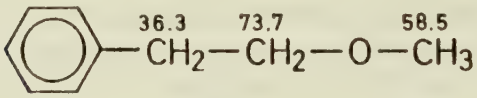


Abbildung 26: 13-C-chemische Verschiebung der aliphatischen Kohlenstoffatome von Phenyläthylmethyläther in ppm.

* p-Brom-methylbenzoesäure-PEG-3000-ester

Bei dieser Verbindung wurde sowohl der Einfluß der direkt an den aromatischen Ring gebundenen Carbonsäure, als auch die Veresterung mit PEG-3000 untersucht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 23 den Verschiebungswerten von Peak 2 der Huminsäure gegenübergestellt.

Gemessen wurde eine 1 molare Lösung von p-Brom-methylbenzoesäure-PEG-3000-ester in D_2O.

	PEG-3000-Ester	Huminsäure Peak 2	Delta
C - 1	149.1	154.1	5.0
C - 2	129.6	115.4	14.2
C - 3	132.4	128.4	4.0
C - 4	132.6	131.1	1.5
C - 5	132.4	128.4	4.0
C - 6	129.6	115.4	14.2

Tabelle 23: Verschiebungswerte des PEG-Esters werden mit den Verschiebungswerten des Huminsäure Peak 2 verglichen (Lösungsmittel D_2O). Angaben in ppm.

1) Ich danke den Arbeitskreisen Prof. Rieker und Prof. Rundel für die Überlassung der Substanzen.

Die starken Unterschiede in den Verschiebungswerten zeigen, daß eine direkt an die Aromaten gebundene Carbonsäure, nach den bisher vorliegenden Ergebnissen, im Huminsäure-Molekül nicht nachgewiesen werden kann.

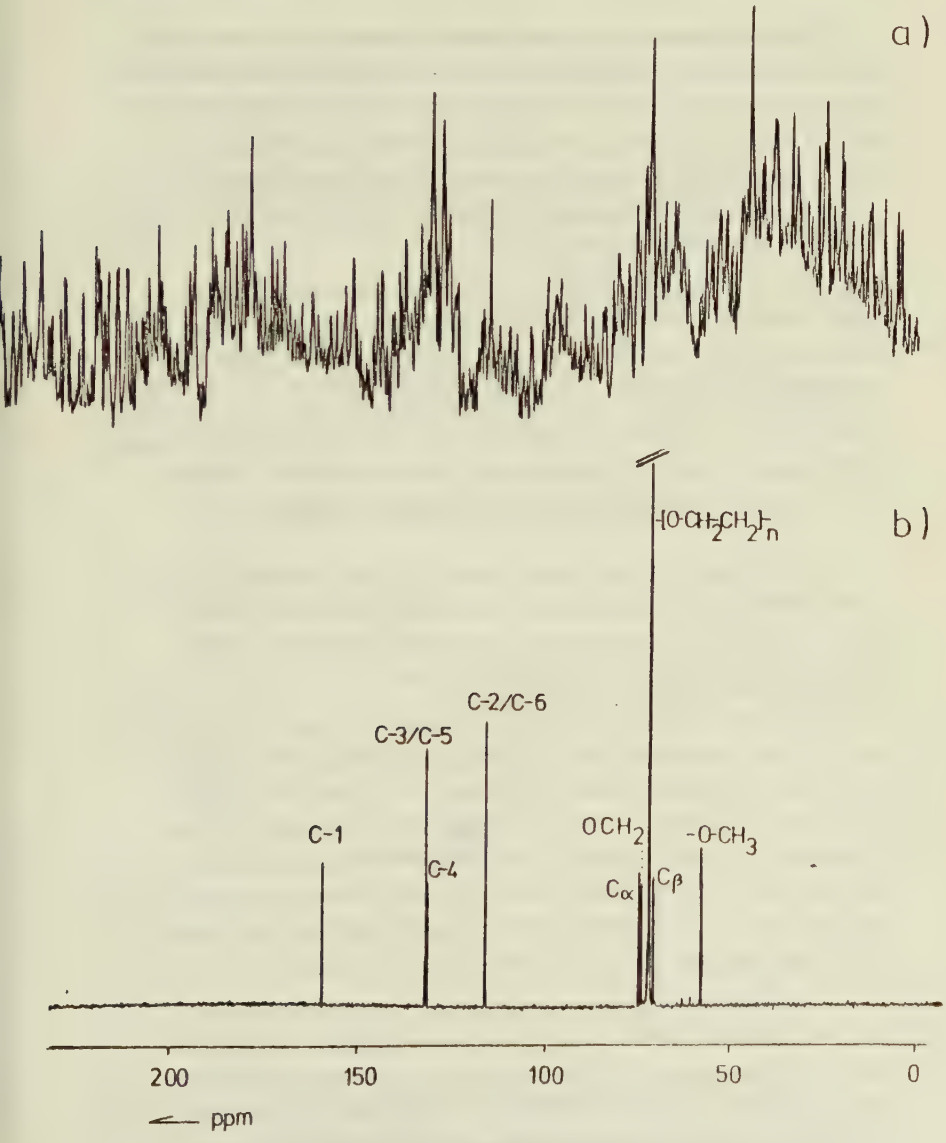


Abbildung 27: Vergleich der 13-C-NMR-Spektren von Peak 2 (a) und p-Methoxybenzyl-PEG-3000 (b).

9.6. Zusammenfassende Interpretation der NMR-Spektroskopischen Untersuchungen

Die Protonenresonanz bei 3.68 ppm läßt sich mit Hilfe der 13-C NMR-Spektroskopie eindeutig identifizieren. Wie die Ergebnisse zeigen, handelt es sich hierbei nicht um eine Methoxyresonanz, wie zum Beispiel in den verschiedenen Ligninbausteinen und in anderen Modellsubstanzen, sondern um eine Oxyäthylen-Gruppe ($-O-CH_2-$), was aufgrund der chemischen Verschiebung der 13-C NMR-Spektren eindeutig bewiesen ist.

Die 1-H und 13-C NMR-Spektren sind sowohl vom Erscheingsbild (zum Beispiel Halbwertsbreite, siehe II.9.4.2), als auch vom Verschiebungswert her (Lösungsmittel D_2O) mit der PEG-Bande der Modellsubstanz identisch (siehe Abb.23 und 27).

Bei den anderen -O-Alkyl-Substituenten ist entweder der Verschiebungswert oder das Erscheinungsbild nicht mit den Ergebnissen der Huminsäure-NMR-Spektren in Einklang zu bringen.

Die zunehmende Strukturierung in den 13-C NMR-Spektren der Huminsäurefraktionen erlaubt erstmals die Darstellung gut aufgelöster, scharfer 13-C-Resonanzen von nativen Huminsäure-Strukturelementen (siehe Tabelle 16 und Abbildung 15).

Die 13-C NMR-Spektren von Peak 2 und Peak 3 zeigen im aromatischen Bereich Resonanzen, die typisch sind für den Einfluß O-substituierter Kohlenstoffatome (110.5 ppm, 114.1 ppm, 115.4 ppm). Auch ergibt sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung mit den Resonanzen von p-Methoxybenzyl-PEG-3000, die bei 116.5 ppm und bei 132.7 ppm (siehe Tabelle 16 und 22), also innerhalb des Fehlerbereiches von 2.4 ppm liegen. Die entsprechenden Werte der Huminsäurefraktionen sind bei 115.4 ppm und bei 131.1 ppm.

Die Polyoxyäthylen-Kohlenstoffatome der Vergleichssubstanz und die singuläre Resonanz der Huminsäurefraktionen weisen gleiche Verschiebungswerte auf (72.0 ppm bzw. 72.1 ppm, Lösungsmittel D_2O). Das heißt, daß mit Hilfe der 13-C NMR-Spektroskopie die Verknüpfung zwischen Oxyäthylenstrukturen und den Aromaten bewiesen ist (siehe Abb. 27).

Die quartären Resonanzen von p-Methoxybenzyl-PEG-3000 können aufgrund ihres NOE-Effektes in Peak 2 und Peak 3 nicht eindeutig detektiert werden.

Neben dem durch diese Modellsubstanzen beschriebenen System können noch weitere Strukturelemente vorliegen, wie zum Beispiel aromatische Polyäther (siehe II.9.3.).

Phenylpropan-Bausteine, Lignindimere, Glycerinderivate etc. können ausgeschlossen werden. Die Carbonsäuren scheinen hauptsächlich über verzweigte aliphatische Seitenketten gebunden zu sein.

Bei den untersuchten Huminsäurefraktionen handelt es sich offensichtlich um kompliziertere Einheiten.

Im Gegensatz zu anderen Autoren (13, 22-28) können als Bausteine des Huminsäure-Grundgerüsts folgende Elemente vorgestellt werden:

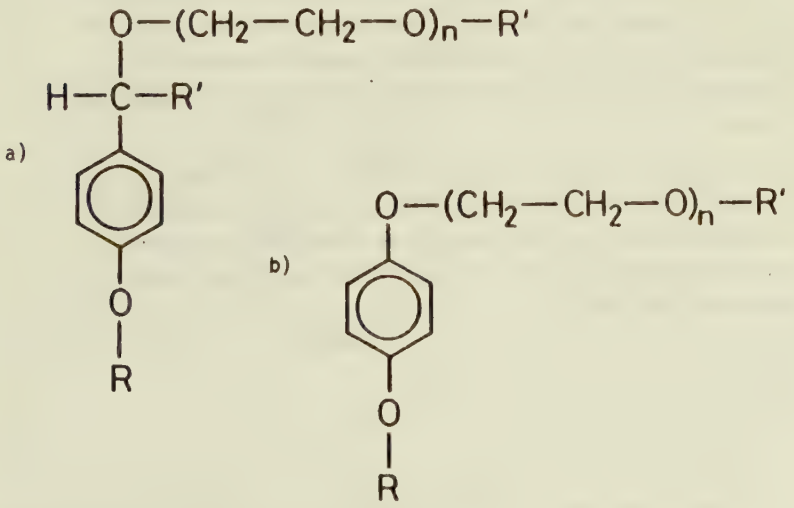


Abbildung 28: Strukturvorschlag für die Bausteine aus dem Huminsäure-Grundgerüst. n = 3-6; R = Arylrest, H oder R' R' = stark verzweigter, aliphatischer Rest mit Carboxylgruppen.

Der Nachweis auf Polyäthylenglycolstrukturen mit dem Dragendorff-Bürger-Reagenz ist ab n = 6 positiv (150,151). In den Huminsäurefraktionen war aber dieser Nachweis nicht eindeutig zu führen.

Bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Äthylenglycolbausteinen wurde festgestellt, daß erst ab n = 3 eine singuläre Resonanz in den Spektren auftritt (152). Deshalb wird n mit 3 - 6 angegeben.

Folgendes muß betont werden: die Interpretation der NMR-Spektren wird dadurch erschwert, daß es sich wahrscheinlich nicht um oftmals wiederkehrende Verbindungen handelt, sondern um Superpositionen verschiedenster Strukturelemente.

Jedoch konnten durch Vergleich mit den gemessenen Modellsubstanzen Hinweise bestätigt werden, bzw. bestimmte Strukturelemente ausgeschlossen werden.

Da die 13-C NMR-Spektren sehr stark durch sterische, jedoch nur in geringem Maße (bis zu 2.5 ppm) durch Anisotropie-Effekte beeinflußt werden (153), dürften die vorgeschlagenen Strukturelemente ein realistisches Bild der Huminsäure-Grundstruktur liefern.

Mit diesen Ergebnissen werden konkrete Strukturbausteine aus dem nativen Grundgerüst von Huminsäure aus Abwasser angegeben. Erste Einblicke in die Struktur dieser komplexen Verbindungsklasse wurden mittels Messungen von Modellsubstanzen bestätigt und somit abgesichert.

Durch Kombination der beiden Strukturelemente a) und b) aus Abbildung 28 läßt sich zum Beispiel folgende Gesamtstruktur für das Huminsäure-Grundgerüst konstruieren:

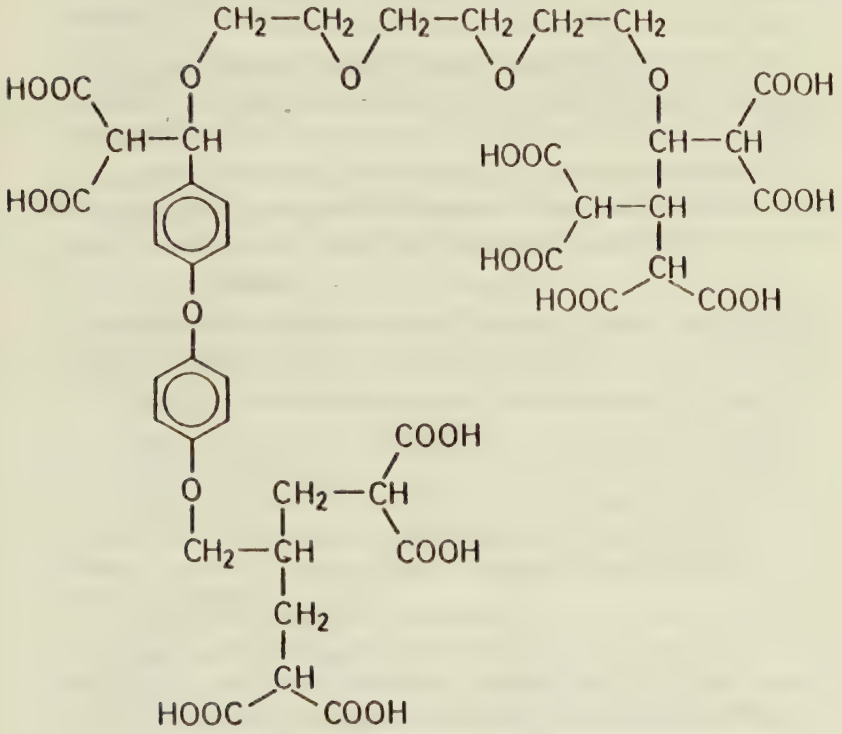


Abbildung 29: Vorgeschlagener Baustein aus dem Grundgerüst der Huminsäure aus Abwasser.

9.7. Diskussion

Die Untersuchungen des nativen Huminsäure-Moleküls mit herkömmlichen spektroskopischen Methoden, wie z.B. UV- und IR-Spektroskopie, brachten keine wesentlichen Einblicke in die Struktur des Grundgerüsts. Die UV- und IR-Spektren der hydrolysierten und der unhydrolysierten Proben zeigten kaum Unterschiede.

Zur Identifizierung von Strukturelementen aus dem Grundgerüst mußten also andere Methoden herangezogen werden. Hier bot sich die NMR-Spektroskopie an, die sich in den letzten Jahren - vor allem bei der Untersuchung von Naturstoffen - als eine sehr aussagekräftige Methode zur Konstitutionsaufklärung erwies (besonders die 13-C-Meßtechnik, siehe 138, 139).

Die bisher vorliegenden Ergebnisse aus den 1-H NMR-Spektren von Boden-Huminsäuren konnten allerdings keine Fortschritte in Richtung einer Strukturaufklärung liefern (14, 141, 142, 154-156).

Barton (141) und Atherton (154), die Huminsäuren aus Bodenextrakten untersuchten, konnten im NMR-Spektrum keine aromatischen Protonen nachweisen. Atherton, der auch hydrolysierte Proben analysierte, macht für das Fehlen der aromatischen Protonen eine zu geringe Konzentration oder den starken Relaxationseffekt des Spins ungepaarter Elektronen verantwortlich.

Erst Cheshire (155), der Boden-Huminsäuren methylierte und dann untersuchte, konnte aromatische Protonen nachweisen. Ebenso fanden Lentz (157) und Lüdemann (142) bei natürlichen und synthetischen Huminsäuren aromatische Ringprotonen und aliphatische Protonen von CH_3- und CH_2- Gruppen. Bisher gelang es aber noch nicht, den Anteil aromatischer und aliphatischer Strukturelemente mittels der NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Auch in den jüngsten 1-H NMR-Spektren von Boden-Huminsäuren (145) läßt sich der aromatische Bereich nicht deuten und im aliphatischen Bereich wird lediglich die Resonanz bei 3.8 ppm als Methoxyresonanz identifiziert.

Hierbei ist zu beachten, daß die Protonenresonanzen nur in einem Bereich von 10 ppm liegen. Hingegen umfassen die 13-C-che-

mischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome in organischen Verbindungen etwa 240 ppm. Da die Resonanzfrequenz der Protonen der vierfachen Resonanzfrequenz der 13-C-Kerne entspricht, ergibt sich im Frequenzmaßstab für 13-C das sechsfache des Protonenresonanzbereichs. Die 13-C NMR-Messung zeigt also Unterschiede in der chemischen Umgebung wesentlich deutlicher an als die Protonenresonanz.

Das bestätigen zum Beispiel 13-C-Messungen von Boden-Huminsäuren und von Huminsäuren aus dem Meeres-Sediment. Die NMR-Spektren lassen sich in vier Verschiebungsbereiche untergliedern (144, 158).

Ein Nachteil ist aber, daß die natürliche Konzentration an 13-C nur 1,1 % beträgt. Für eine Messung - auch bei 5000 bis 10 000 Akkumulationen - sind also Mindest-Substanzmengen von ca. 50 mg erforderlich.

Hier ergaben sich für die 13-C-Messungen der Huminsäurefraktionen aus zwei Gründen meßtechnische Schwierigkeiten:

a) wegen des hohen Molekulargewichts der Fraktionen

b) wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen (3 bis 5 mg pro Fraktion).

Durch die unter III.10.2.näher beschriebene speziell entwickelte Meßtechnik konnten die auftauchenden Probleme jedoch erfolgreich bewältigt werden.

Sowohl in den 1-H als auch in den 13-C NMR-Spektren ist von Peak 1 nach Peak 3 eine zunehmende Strukturierung festzustellen. Bei Peak 2 und Peak 3 läßt sich im 1-H NMR-Spektrum der aromatische Bereich als ein überlagertes AA´BB´-System deuten.

Der Kombinationsvergleich von 1-H und 13-C NMR-Spektren ermöglicht eine eindeutige Zuordnung von Resonanzen. So kann die 1-H Resonanz bei 3.68 ppm mit Hilfe der 13-C NMR-Spektroskopie als Oxyäthylengruppierung identifiziert werden.

Bei den 13-C-NMR-Messungen ist die Darstellung gut aufgelöster, scharfer 13-C-Resonanzen von nativen Huminsäure-Strukturelementen gelungen. Außerdem lassen sich die 13-C-Spektren in vier Bereiche

einteilen: a) Aliphatischer Bereich b) Hydroxymethyl Bereich c) Aromatischer Bereich d) Carbonyl Bereich.

Die gute Strukturierung der Spektren ist mit Sicherheit eine Folge der erst nach Abspaltung der peripheren Bausteine durchgeführten Fraktionierung des Huminsäure-Grundgerüstes. Somit war von vornherein eine Störung durch gebundene Aminosäuren, Kohlenhydrate und Metalle ausgeschaltet.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die große Aussagekraft der 13-C NMR-Methode bei der Analyse von Biopolymeren (138, 139, 148, 149, 158).

Zu berücksichtigen ist allerdings, daß es in den Biopolymeren feste und bewegliche Regionen gibt. Dabei besitzen nur die 13-C-Kerne der flexiblen Anteile des Moleküls genügend lange transversale Relaxationszeiten, um in einem hochauflösenden Spektrum sichtbar zu sein. Die weniger beweglichen Anteile zeigen breitere Peaks (143). Eine exakte Zuordnung läßt sich also nur mit entsprechenden Modellsubstanzen absichern. Durch Kombinationsvergleich mit den Meßergebnissen von synthetisierten Modellsubstanzen war hier die exakte Identifizierung von Huminsäure-Strukturelementen möglich. Somit konnten erstmals konkrete Strukturelemente aus dem nativen Huminsäure-Grundgerüst angegeben werden.

10. Zur Herkunft der Huminsäure

10.1. Mikrobiologische Darstellung von Huminsäure

In einer Laborkläranlage (drei parallel geschaltete Anlagen) wurde ein Versuch zur Biosynthese von Huminsäure durchgeführt (siehe III.12.).

Nach Adaption der Mikroorganismen des Belebtschlamms an Anlage und Substrat (vier Tage) wurden Ablaufproben gezogen, sterilfiltriert und nach III.1. aufgearbeitet.

10 mg Huminsäure pro Liter Sterilfiltrat konnten isoliert werden. Die E_4/E_6-Werte lagen bei allen drei Anlagen zwischen 4.2 und 5.4 und sind für Huminsäure charakteristisch. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung standen in Übereinstimmung mit den jeweiligen Spektren des Huminsäure-Konzentrats aus der Kläranlage Kirchentellinsfurt (siehe dort). Die Bildung der Huminsäure durch die Mikroorganismen des Belebtschlammes - unabhängig vom Substrat - scheint damit bewiesen zu sein. Unklar ist, ob die Huminsäure über biochemische Prozesse aus dem definierten Substrat gebildet wird, oder ob sie bei der Autolyse von Mikroorganismen frei wird.

10.2. Analyse des Zulaufs der Kläranlage Kirchentellinsfurt

Um zu klären, ob die Huminsäure aus dem Ablauf der Kläranlage ausschließlich in der biologischen Stufe der Anlage gebildet wird, war es notwendig, den Zulauf auf seinen Gehalt an Huminsäure zu untersuchen.

Die Aufarbeitung der Wasserproben des Zulaufs erfolgte nach III.1.

Es zeigte sich, daß auch im Zulauf ein bestimmter Anteil von Huminsäure vorhanden war. Die Konzentration im Zulauf machte durchschnittlich nur 50 % der Ablaufkonzentration aus (also 3.0 mg Huminsäure pro Liter Sterilfiltrat).

Das bedeutet:

a) die Huminsäurebildung läuft bereits im Zulauf an (Umsetzungsprozesse durch Mikroorganismen)

b) wasserlösliche Anteile der Boden-Huminsäure werden ausgespült und durchlaufen die Anlage

Für a) spricht der Versuch zur Darstellung von Huminsäure im Labor mittels Mikroorganismen aus dem Belebtschlamm und huminsäurefreiem Substrat (TSB) (siehe Exp. Teil).

Für b) spricht ein Ansteigen des Huminsäuregehalts bei hohem Schmelzwasser-Anteil im Zulauf (Schneeschmelze). Die Huminsäure-Konzentration ist dann bis auf das vierfache des Durchschnittswerts (12 mg Huminsäure pro Liter Sterilfiltrat aus dem Zulauf) erhöht. Im Ablauf ist eine entsprechende Erhöhung festzustellen.

Im Endeffekt wird sich der Huminsäure-Gehalt im Ablauf der Kläranlage sowohl aus wasserlöslichen, ausgespülten Boden- Huminsäure-Anteilen, als auch aus biochemisch durch Mikroorganismen synthetisierten Huminsäure-Anteilen zusammensetzen.

10.3. Allgemeine Aussagekraft der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse stützen sich im Wesentlichen auf die Analyse der Huminsäure aus dem Ablauf der mechanisch-biologischen Kläranlage in Kirchentellinsfurt. Untersuchungen der Ablaufproben anderer Anlagen zeigten in Vorversuchen ähnliche Ergebnisse. Somit können die Charakteristika der Huminsäure aus Kirchentellinsfurt allgemein als Charakteristika der Huminsäure aus Abwasser gewertet werden.

Untersucht wurden die Abläufe der Kläranlagen Eutingen (im Zulauf Brauereiabwässer) und der Kläranlage Steinlach-Wiesaz (im Zulauf Industrieabwässer). In beiden Fällen konnte Huminsäure aus dem Ablauf isoliert werden.

Die Huminsäure wurde analog III.1. aufgearbeitet. Die Übersichtsspektren (siehe Abb. 5), die E_4/E_6-Werte (sie liegen zwischen 4.0 und 5.0) und die 1-H-NMR-Spektren (siehe Abb.14a) waren mit den Ergebnissen der Kirchentellinsfurter Huminsäure identisch.

III. Experimenteller Teil

1. Probenaufarbeitung

Die Proben wurden mit Hilfe eines automatischen Wasser-Proben-Entnahme-Gerätes FW 1 der Firma Schmid (Unterjesingen) zeit- und mengenproportional gezogen (siehe Abb. 30).

Die in bestimmten Zeitabständen automatisch aus dem Ablauf der Kläranlage hochgepumpten Mengen wurden in einem Großbehälter gesammelt. Es wurden Proben genommen während 24 Stunden, während der durchschnittlichen Gesamtbelastungszeit (zwischen 6^{00} Uhr und 22^{00} Uhr) und während der Hauptbelastungszeit der Anlage zwischen 8^{00} Uhr und 16^{00} Uhr.[1)]

Ein Unterschied im Huminsäuregehalt konnte nicht ermittelt werden. Vielmehr scheint sich jeweils ein Durchschnitts-Huminsäure-Gehalt einzustellen.

Die Proben wurden sofort sterilfiltriert, um weitere biochemische Prozesse auszuschalten. Die Sterilfiltrationszelle wurde über ein Vorratsgefäß (Volumen 5 l) gespeist. Die Sterilfiltration erfolgte unter Druck (2 - 2.5 bar Stickstoff) über ein Glasfaser-Vorfilter (Selectron GF 92) und ein Selectron BA 83 / 1 Filter der Porengröße 0.2 µm der Firma Schleicher & Schüll.

Nach Sterilfiltration wurden die Proben entweder gleich weiterverarbeitet oder tiefgekühlt (bei - 10° C) gelagert. Die so von Schlammresten, Algen, Plankton und Mikroorganismen gereinigten Proben waren für die Isolierung der Huminsäure vorbereitet.

Zur selektiven Isolierung der Huminsäure wurde die Ultrafiltrations-Technik eingesetzt. Ein Verfahren, das sich bei der Anreicherung und Reinigung von makromolekularen Substanzen, wie zum Beispiel wasserlöslichen Polymeren (159-162) schon bewährt hat. Die Ultrafiltrations- und Sterilisationszellen wurden in der Werkstatt des Chemischen Zentral-Instituts angefertigt.

---

1) Ich danke Herrn K. Ehing und Herrn M. Walker von der Kläranlage Kirchentellinsfurt für ihre Hilfsbereitschaft bei der Probenentnahme.

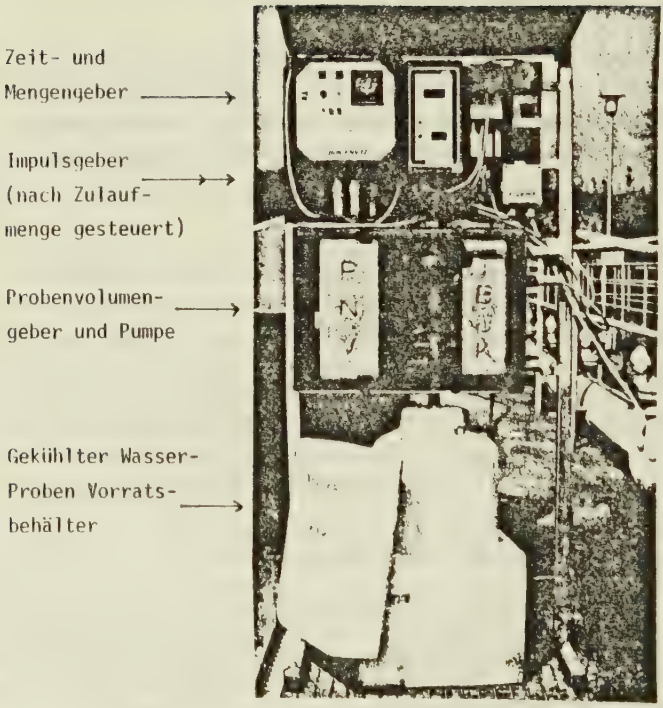


Abbildung 30 : Automatisches Wasser-Proben-Entnahmegerät FW 1
der Firma Schmid (Unterjesingen).

Die Ultrafiltration ist eine beschleunigte Dialyse über Membranfilter. Verwendet wurden UM-2-Membranen (Ausschlußgrenze 1000 dalton) und UM-10-Membranen (Ausschlußgrenze 10 000 dalton) der Firma Amicon. In einer Ultrafiltrations-Druckzelle, die kontinuierlich über ein Vorratsgefäß (Volumen 5 l) mit Sterilfiltrat gespeist wird, konzentriert man unter kräftigem Rühren die Probe auf (Druck: 2 - 2.5 bar Stickstoff).

In der gleichen Anlage kann die Probe auch unter Konstanthalten des Volumens gespült werden (Diafiltration).

Die von jeweils 5 l auf 100 ml aufkonzentrierten Proben wurden bis zur vollständigen Entsalzung (Nachweis auf Chlorid, Sulfat, Nitrat und Phosphat im Auslauf negativ) mit sterilfiltriertem, destilliertem Wasser gespült (bis zur dreifachen Menge des Ausgangsvolumens). Der Anreicherungsprozeß wurde über UV-Messungen verfolgt (siehe II.4.3/4.4).

Das eingeengte Konzentrat war stark trüb. Beim Stehenlassen setzte sich ein weißlich-grauer Niederschlag ab. Der klare Überstand wurde dekantiert. Der Niederschlag löste sich in Säure unter Schäumen auf (CO_2-Entwicklung). Er konnte als $CaCO_3$ identifiziert werden.

Offenbar wurde hier $CaCO_3$ durch Adsorption an Huminsäure und die Ultrafiltrationsmembran angereichert. Um diese niedermolekularenanorganischen Anteile vollständig abzutrennen, war ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich.

Das gelbbraune Konzentrat wurde lyophilisiert oder bis zur Trockne am Rotationsverdampfer i.V. abgezogen (Wasserbadtemperatur maximal 40° C).

Als weiterer Reinigungsschritt wurde die Gelchromatographie angeschlossen. Das getrocknete Huminsäure-Konzentrat wurde in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen und auf die Chromatographie-Säule aufgetragen. Bei der Gelfiltration von wasserlöslichen Substanzen mit Sephadex-G-15-Gel liegt der Fraktionierbereich unter 1500 dalton.

Quickfit-Säule: h = 90 cm, r = 1.25 cm
Füllmaterial: Sephadex-G-15, 120 g, Quellfaktor: 3.55
Laufmittel: destilliertes Wasser (entgast, pH ca. 7.0)
Tropfgeschwindigkeit: 1 ml/min
Fraktionssammler: ISCO-Model 328
UV-Detektor (254 nm): Model 1132. Mit Auto-Scale-Expansion,
Multiplexer Expander ISCO-Model UA-5
Papiervorschub: 3 cm/min
Das Ausschlußvolumen wurde mit Rinderserumalbumin
zu V_0 = 125 ml bestimmt.

2. Vorproben auf Kontaminationen

2.1. Aminosäuren und Peptide

Je 10 µl von Lösungen der Konzentration 1 mg/ml wurden auf eine DC-Kieselgelplatte (Firma Merck 60 F 254) aufgetragen. Das Gemisch setzte sich aus Ileu, Val, Ala und Gly zusammen. Die Konzentration der Huminsäurelösung betrug 10 mg/ml.

Getestet wurde auf die Anwesenheit freier Peptide und Aminosäuren.

Laufmittel: Butanol - Eisessig - Wasser (4:1:1; vol:vol)
Laufzeit: 1 Stunde
Sprühreagenz: Ninhydrin oder Chlor-o-tolidin.

Ninhydrin-Sprühreagenz für die Dünnschichtchromatographie (163)
100 ml n-Butanol
300 mg Ninhydrin p.A.
3 ml Eisessig p.A.

Nach dem Besprühen 10 min bei 110° C im Trockenschrank entwikkeln. Das Reagenz ist nicht beständig und muß stets frisch angesetzt werden.

Ninhydrin-Reagenz für die alkalische Hydrolyse und den Aminosäure-Analysator (164).
100 ml 4 N Natriumacetatpuffer p.A.
300 ml Diäthylenglycolmonomethyläther (Methylcellosolve)
8 g Ninhydrin p.A.
0.16 g $SnCl_2 \times 2\ H_2O$ p.A.

Das Reagenz ist nicht beständig und muß stets frisch angesetzt werden.

Chlor-o-tolidin (163)
Chlorierung: DC-Platte 5-10 min in Chloratmosphäre stellen (Chlorbombe). Dann 5 min an der Luft stehen lassen, um den Chlorüberschuß zu entfernen.

Sprühlösung: 0.16 g o-Tolidin werden in 30 ml Eisessig p.A. gelöst. Man füllt mit destilliertem Wasser auf 500 ml auf und fügt 1g Kalium-Jodid hinzu. Es tritt Blaufärbung ein (165).

2.2. Kohlenhydrate

Je 10 µl von Lösungen gleicher Konzentration (1 mg/ml) von Stärke, Glucose, Xylose und Rhamnose wurden auf DC-Kieselgelplatten (Firma Merck) aufgetragen. Die Konzentration der Huminsäurelösung betrug 10 mg/ml.

Laufmittel:	Toluol - i-Propanol - Essigester - Wasser (20:50:25:5; vol:vol)
Laufzeit:	30 min
Sprühreagenz:	Tetrazolblau

Tetrazolblau-Sprühreagenz (163)
a) Tetrazolblau (Tri-phenyl-tetrazolium-chlorid) 0.5 % Tetrazolblau in Methanol p.A.
b) 6 N NaOH in destilliertem Wasser
Gleiche Volumina von a) und b) werden vor dem Gebrauch gemischt. Violette Färbung bei Zimmertemperatur oder schwachem Erwärmen.

3. Bestimmung des Gesamt-Aminosäure-Gehalts der Huminsäure

3.1. Alkalische Hydrolyse

Einer Huminsäure-Lösung der Konzentration 10 mg/ml wurden je 100 µl entnommen, mit 2 ml 2.5 N NaOH versetzt und 2.5 Stunden bei 95° C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde dem Hydrolysat 2 ml 30 %iger Essigsäure und 1 ml Ninhydrin-Reagenz zugesetzt.

Die Proben wurden im PMQ II Zeiss Photometer bei 570 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen und der Gesamtaminosäuregehalt über eine Isoleucin-Eichkurve bestimmt.

10	25	50	75	µg Isoleucin/100 µl
0.047	0.13	0.25	0.38	E-570 nm

Tabelle 24: Eichkurve mit Isoleucin

Aus einer Huminsäurelösung der Konzentration 10 mg/ml destilliertes Wasser wurden jeweils 100 µl Probe entnommen und analysiert (siehe oben).

Ergebnis: $E_1 = 0.14$ $E_2 = 0.16$ $E_3 = 0.15$

3.2. Aminosäure-Analysator[1)]

Die Trennung der Aminosäuren nach Hydrolyse der Huminsäure erfolgte im Multichrom-B-Flüssigkeits-Säulenchromatograph der Firma Beckman-Instruments-München nach dem Einsäulen-Verfahren von Spackman et al. (164).

---

1) Ich danke Frau S. Naumann und Frau G. Oehling für die Durchführung der Analysen.

Säule: h = 60 cm,
d = 0.9 cm.
Füllmaterial: Kationenaustauscher M 72, Beckman
Vernetzungsgrad: 7 %
Korngröße: 15 - 20 µm
Pufferdurchfluß: 50 ml pro Stunde
Ninhydrindurchfluß: 25 ml pro Stunde
Temperatur des Säulenmantels: 55° C

Zur Elution der Aminosäure wird Citrat-Puffer der pH-Bereiche 3.2, 4.3 und 6.3 eingesetzt.

Das Hydrolysat wurde jeweils in Citrat-Puffer aufgenommen (pH 3.2) und ein Aliquot (maximal 1.0 ml) zur Trennung auf die Säule aufgetragen.

4. Hydrolyse mit 6 N HCl nach (122)

10 bis 20 mg Huminsäure in 5 ml 6 N HCl p.A. werden in einer Hydrolyseampulle in flüssiger Luft eingefroren. Die Ampulle wird evakuiert und unter Vakuum zugeschmolzen; anschließend 24 Stunden bei 110° C im Trockenschrank inkubiert.

Nach Abkühlen wird das Hydrolysat quantitativ aus der Ampulle überführt, durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Rotina-S der Firma Hettich) vom unlöslichen Rückstand befreit und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer i.V. abgezogen (Wasserbadtemperatur maximal 40° C).

4.1. Verluste bei der Hydrolyse

Quantitative Aufarbeitung der Huminsäure-Hydrolysate
Einsatz: 30 mg Huminsäure
Nach saurer Hydrolyse ergaben sich:
4.0 mg unlöslicher Rückstand (Zentrifugat)
4.5 mg aus 30 mg Huminsäure abgespaltene Kohlenhydrate, Aminosäuren, Metalle
12.0 mg Hydrolyse-Konzentrat nach Ultrafiltration (ABHA).

Der absolute Verlust liegt bei 60 %, denn von den eingesetzten 30 mg Huminsäure konnten nach Hydrolyse und Aufarbeitung effektiv nur 12 mg ermittelt werden (Hydrolyse-Konzentrat nach Ultrafiltration).

4.2. Aufarbeitung des Hydrolysats

Das Hydrolysat wurde in 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen und unter Rühren (Magnetrührer) mit 1 N NaOH neutralisiert. Das so für die Membranfiltration vorbereitete Hydrolysat wurde bis zur vollständigen Entsalzung (Nachweis auf Chlorid negativ) ultra- und diafiltriert. Das Konzentrat wurde quantitativ in einen Kolben überführt, eingeengt und, nach Trocknen im Exsikkator, ausgewogen.

4.3. Modellhydrolyse

Zusammensetzung des Gemisches

Das Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander entspricht weitgehend der im Huminsäure-Molekül gefundenen Verteilung (II.6, II.7.).

Kohlenhydrate		Aminosäuren
Rhamnose	11 mg	Rinderserumalbumin zeigt eine
Ribose	3 mg	durchschnittliche Aminosäure-
Mannose	9 mg	Verteilung. Deshalb wurden
Arabinose	10 mg	hiervon 30 mg eingesetzt.
Galactose	11 mg	
Xylose	17 mg	
Glucose	17 mg	

78 mg Kohlenhydrate und 30 mg Protein

Die Kohlenhydrate wurden mit Rinderserumalbumin gut vermischt. Je 20 mg wurden entnommen, nach III.4. hydrolysiert und aufgearbeitet.

Aufarbeitung des Hydrolysats

Das Modellhydrolysat wurde mit 10 ml destilliertem Wasser aufgenommen und unter Rühren (Magnetrührer) mit 1 N NaOH neutralisiert.

Anschließend wurde bis zur vollständigen Entsalzung (Nachweis auf Chlorid negativ) in einer Ultrafiltrationszelle nach III.1. unter Druck und kräftigem Rühren (Magnetrührer) mit 500 ml destiliertem Wasser diafiltriert.

Das Konzentrat (Überstand) wurde quantitativ in einen Kolben überführt und am Rotationsverdampfer i.V. (Wasserbadtemperatur maximal 40° C) bis zur Trockne abgezogen. Das Filtrat wurde analog behandelt.

5. Bestimmung des Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalts der Huminsäure

Anthron-Reagenz

0.2 g Anthron werden in 5 ml Äthanol (absolut) verrührt und mit 75 %iger H_2SO_4 (75 ml H_2SO_4 konc. und 25 ml destilliertes Wasser) auf 100 ml aufgefüllt. Bis zur vollständigen Lösung des Anthrons wird gerührt.

Das Reagenz ist nicht beständig und muß stets frisch angesetzt werden.

5.1. Anthron-Reaktion

10 mg des Huminsäure-Konzentrats wurden in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden entnommen (entsprechen 1 mg Huminsäure) und auf 0° C abgekühlt. Anschließend unterschichtet man mit 5 ml Anthronreagenz, mischt gut durch und läßt weitere 5 min gekühlt stehen.

Dann wird die Probe 10 min. bei 95° C im Wasserbad erhitzt und danach wieder abgekühlt.

Im PMQ II Zeiss Photometer wurden die Proben bei 625 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen und der Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalt über eine Glucose-Eichkurve bestimmt.

10	25	50	75	µg Glucose/100 µl
0.06	0.14	0.29	0.43	E-625 nm

Tabelle 25: Eichkurve mit Glucose

Jeweils 100 µl der Huminsäurelösung wurden getestet (siehe oben).

Ergebnis: $E_1 = 0.39$ $E_2 = 0.41$ $E_3 = 0.40$

5.2. Hydrolyse mit Trifluoressigsäure

In einem Hydrolyseglaschen wurden 2 mg Huminsäure unter Luftabschluß in 5 ml 1.8 N TFA 5 bis 7 Stunden bei 100° C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen überführt man das Hydrolysat quantitativ in einen Spitzkolben und zieht die TFA am Rotationsverdampfer i.V. bei einer Wasserbadtemperatur von maximal 40° C ab. Anschließend nimmt man mit etwas destilliertem Wasser auf und engt erneut bis zur Trockne ein. Das trockene Hydrolysat wird mit 0.4 M Boratpuffer pH 9.3 aufgenommen und ein Aliquot in den Zuckeranalysator eingespritzt.

Das Zuckergemisch zur Erstellung des Eich-Chromatogramms wurde analog behandelt.

Zuckergemisch:
Je 10 mg Glucose, Xylose, Galactose, Arabinose, Mannose, Ribose und Rhamnose wurden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. 1 ml der Lösung wurde bis zur Trockne eingeengt und anschließend mit 5 ml 1.8 N TFA aufgenommen.

Das getrocknete Hydrolysat wurde in 1 ml 0.4 M Boratpuffer pH 9.3 gelöst und davon 100 µl in den Zuckeranalysator eingespritzt (entsprechend 100 µg je Zucker).

5.3. Kohlenhydrat-Analysator[1)]

Die Trennung erfolgte nach dem Einpufferverfahren (Dr.H. Bauer, Chem. Institut Tübingen).

Säule: 0.6 x 28 cm
Füllmaterial: Durrum DA-X4
Laufmittel: 0.4 M Boratpuffer pH 9.3
Pufferdurchfluß: 60 ml pro Stunde
Säulentemperatur: 55° C

1) Ich danke Herrn Dr.H. Bauer für die Durchführung der Analysen.

6. Röntgenogramm (166)

Die Proben wurden auf eine Folie aufgetragen, die auf ein Gitterfenster gespannt war.

Gemessen wurde die unhydrolysierte und die hydrolysierte Huminsäure aus Abwasser.[1)]

Aufnahme: Guinier-Aufnahme
Strahlung: $Cu_{K\alpha 1}$ - Strahlung
Wellenlänge: 1.54051 Å (154.051 pm)
Kamera: Enraf-Nonius 624 Guinierkamera
Belichtungsdauer: 12 Stunden
Standard: Silicium

---

1) Ich danke Herrn Adams für die Aufnahme der Röntgenogramme.

7. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Experimentelle Bedingungen

Von einer ABHA-Lösung der Konzentration 1mg ABHA/ml dest. Wasser wurden jeweils 5 µl in den Chromatographen eingespritzt.

Die Auftrennung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Säule: LiChrosorb RP-8 (reversed-phase) Firma E.Merck, Darmstadt
Länge: 25 cm Durchmesser. 3 mm
Meßgröße: 7 µ
Laufmittel: 95 Teile Methanol und 5 Teile destilliertes Wasser
Durchflußgeschwindigkeit. 1 ml/min
Papiervorschub: 2 cm/min
HPLC-Gerät der Firma Waters GmbH, Königstein Taunus
Detektor: UV-Detektor der Firma Waters GmbH, Königstein Taunus
Model 440 Absorbance Detector
λ = 254 nm
Absorptionsmaximum: E = 0.10

8. Pyrolyse GC/MS

Durchführung der Pyrolyse-GC/MS[1)]

Pyrolyse: 300 oder 500 µg der Probe wurden auf eine Platinspirale aufgetragen und i.V. getrocknet. Die Spirale wird in den Einspritzblock eingebaut und bis zur vorgesehenen Endtemperatur (200° C) ausgeheizt. Anschließend wird bis auf 0° C abgekühlt (mit flüssiger Luft) und 1 sec lang pyrolysiert. Die Stromzufuhr der Spirale läuft über einen Transformator und einen Regelwiderstand. Die Pyrolysetemperatur liegt bei ca. 800° C.

Gaschromatographie: Trägergas ist He. Glaskapillarsäule: Emulphor ON 870. Länge: 26 m i. Durchmesser: 0.35 mm
Gasdruck: 0.5 kg/cm^2
In 10 min von 0 bis 50° C, dann Temperaturprogramm von 50 bis 200° C. Mit einer Rate von 3° C/min.
Gerät: Carlo Erba, Fraktovap 2920, Gaschromatograph.

Massenspektrometrie: Gerät: Mat 112 S, Massenspektrometer Varian. Die Massenspektren wurden automatisch aufgezeichnet. 80eV-Ionisationsenergie bei der Aufnahme der Spektren.

---

1) Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Herrn G. Nicholson.

9. Molekulargewichtsbestimmung

9.1. Präparative Ultrazentrifugation

In einer präparativen Ultrazentrifuge E der Firma Beckman-Instruments wurde mit einem Rotor AN-F(Ti) bei maximal 9000 UPM die Sedimentation der Proben spektralphotometrisch verfolgt. Gemessen wurden 2 - 3 ml Lösung der Probe mit einer optischen Dichte von 1.0 bis 2.0 im Bereich der maximalen Absorption im Sichtbaren bei 465 nm (14, S. 63) gegen die gleiche Menge Lösungsmittel.

Die Sedimentationskonstante ist ein Maß für die Dichteverteilung nach Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts. Molekülform, Molekülgröße und das Molekulargewicht spielen hierbei eine Rolle (167, 168).

Die Messungen wurden am MPI für Virusforschung-Abteilung Molekularbiologie durchgeführt.[1)]

9.2. Feld-Desorption[2)]

Die Grundlagen der Methode sind in (169) beschrieben. Die Messungen wurden mehrfach wiederholt. Die Peaks 1 bis 4 wurden im Bereich 0 bis 1000 m/e und 1000-2000 m/e untersucht.

Gerät: Massenspektrometer Varian Mat 711, Varian - Bremen.

---

1) Herrn A. Schöffski danke ich für seine Hilfe.

2) Herrn H. Bartholomä danke ich für die Durchführung der Messungen.

10. NMR-Spektroskopische Untersuchung der Huminsäure[1)]

Probenvorbereitung

Sämtliche Proben wurden 3 Minuten mit gereinigtem Stickstoff begast. Wenn nicht anders angegeben, war das Lösungsmittel D_2O.

10.1. 1-H-NMR-Spektren

90 MHz: Bruker WH 90 Spektrometer
Meßtemperatur: 27° C
Spektrenbreite: 3000 Hz
Pulswinkel: 3.0 µsec
Probenmenge: 15 mg Huminsäure unhydrolysiert und hydrolysiert.
3 - 5 mg je Huminsäure-Fraktion nach Hydrolyse und Aufarbeitung. Bei den anderen Substanzen ist die Menge jeweils gesondert angegeben.

In den Spektren wurde die D_2O-Resonanz nach dem 'gated decoupling-Verfahren' unterdrückt.

Es wurden bis zu 53 000 scans akkumuliert. Die resultierenden Interferogramme wurden mit verschiedenen Glättungsfaktoren multipliziert (LB = 0.3 bis 3.0 Hz) und anschließend transformiert. Die angegebenen Verschiebungswerte wurden auf das Methyl-Signal des 3-(Trimethylsilyl)-propansulfonsäure-Natriumsalzes (TMS-Propansulfonsäure Na-Salz der Firma Merck) bezogen. Die maximale Ungenauigkeit bei dieser Kalibrierungsmethode beträgt $\pm$ 0.03 ppm. Die Integration wurde sowohl graphisch als auch planimetrisch durchgeführt.

---

1) Für die Messungen und die Hilfe bei der Interpretation der Spektren danke ich Herrn Dr.K. Albert.

10.2. 13-C-NMR-Spektren

22,628 MHz: Bruker WH 90 Spektrometer
Meßtemperatur: 30° C.
Spektrenbreite: 6000 Hz
Pulswinkel: 2.5 - 3.0 µsec
Probenmenge: Analog 10.1.
Es wurden bis zu 540 000 scans akkumuliert.

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge wurde bei dieser Substanzklasse erstmalig ein Mikro-Probenkopf zur Messung der 13-C-Spektren eingesetzt. Hierzu wurden bis zu 5 mg Substanz in 50 µl D_2O gelöst und in ein Röhrchen mit folgenden Maßen überführt:

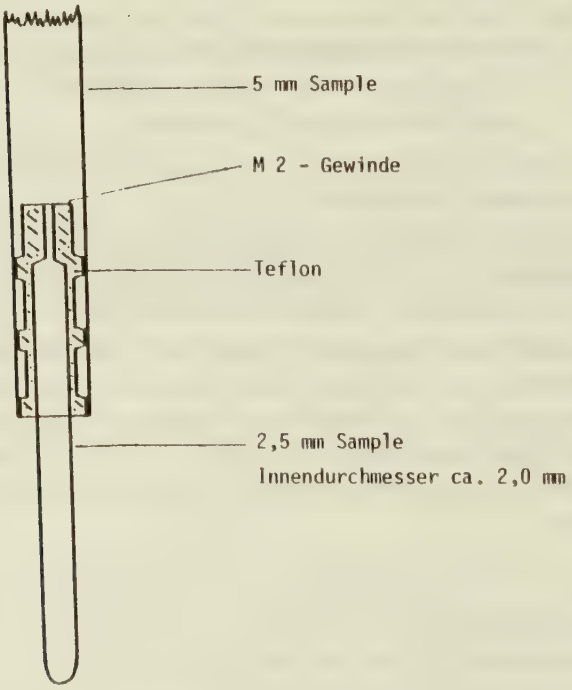


Abbildung 31: Mikro-Probenkopf zur Messung von 13-C-NMR-Spektren geringer Substanzmengen (3 - 5 mg je Huminsäure-fraktion).

Zur Verbesserung des Verhältnisses Signal:Rauschen wurden verschiedene Methoden wie z.B. die exponentielle Multiplikation und verschiedene Glättungsverfahren angewandt.

Zur Erzielung von Höchstauflösung und zur Gewährleistung der Langzeit-Stabilität der Probe (Meßzeiten bis zu 55 Stunden) wurde ein Miniatur-Teflon-Einsatz konstruiert, dessen Anwendung sich bewährte.[1)]

Die Kalibrierung der 13-C-NMR-Spektren erfolgte ebenso wie bei den 1-H-NMR-Spektren auf das Methyl-Signal des TMS-Propansulfonsäure-Na-Salzes (Firma Merck). Die Verschiebung des Methyl-Signals dieser Verbindung in D_2O wurde vor jeder Messung ermittelt. Die digitale Adresse der 13-C-Methylresonanz diente dann als Standard für die nachfolgenden Messungen.

Die maximale Ungenauigkeit bei dieser Kalibrierungsmethode beträgt $\pm$ 0.3 ppm. Jedoch können Verschiebungen in den Spektren weniger durch Kalibrierungsfehler, als vielmehr durch Solvatations- und Konzentrations-Effekte entstehen.

Der Vorteil dieser Kalibrierungsmethode gegenüber anderen besteht darin, daß keine Verunreinigung der Substanz mit Standard möglich ist, und daß keine störenden Standard-Signale (Artefaktmöglichkeit) bei den geringen verwendeten Substanzmengen auftreten können.

Die Meßproblematik bestand darin, daß mit wenig Substanz relativ hoher Löslichkeit eine relativ hohe Konzentration erreicht wird, was für 13-C-NMR-Spektren - wegen der geringen Empfindlichkeit - wichtig ist. Damit erwies sich der Einsatz der beschriebenen Meßanordnung als optimale Lösung der anstehenden Probleme.

---

1) Ich danke der feinmechanischen Werkstatt des chemischen Zentralinstituts für die präzise Anfertigung.

11. Darstellung von Modellsubstanzen[1)]

* Darstellung von p-Methoxy-benzylbromid

Frisch destillierter Anisaldehyd (Kp_{16} = 135° C (170)) wurde unter kräftigem Rühren in einem Dreihalskolben mit $LiAlH_4$ zum Alkohol reduziert: Anisalkohol (Sp = 25° C, Kp_{15} = 116-120° C (170)). In ein Gemisch aus 20 ml (1/4 Mol) des so gewonnenen Alkohols und 50 ml trockenem Benzol wurde unter Rühren HBr eingeleitet. Nach 20 Minuten tritt eine Trübung des Benzol/Anisalkohol-Gemisches auf. Die Temperatur steigt auf 30 -40° C an (vorher konstant bei Zimmertemperatur). Mit einem Eis-Wasser-Gemisch wird die Temperatur zwischen 25 - 30° C gehalten und unter Rühren weitere 2 Stunden HBr eingeleitet. Anschließend läßt man zwei Stunden stehen. p-Methoxy-benzylbromid: Kp_{10} = 135° C (170).

* Darstellung von PEG-3000-Natriumsalz unter Stickstoff

In einem Doppel-Schlenkrohr werden 10 g (3.3 mMol) scharf getrocknetes PEG, MG 3000, zusammen mit etwa 0.4 g einer 50 %igen Natriumdispersion in Paraffin (ca. 10 nMol Na) in etwa 200 ml Tetrahydrofuran gelöst (gelindes Erwärmen im Wasserbad). Nach einer knappen Stunde Rühren bei Zimmertemperatur filtriert man vom überschüssigen Natrium ab. Das Natriumsalz wird unisoliert weiter umgesetzt.

Zur Charakterisierung kann das Natriumsalz mit Diäthyläther ausgefällt und mit 0.1 N Salzsäure titriert werden.

---

1) Ich danke Herrn R. Hengel für seine Hilfe bei der Durchführung der Synthesen.

* Verätherung mit p-Methoxybenzylbromid

Zu der wie oben beschrieben erhaltenen Lösung von PEG-Natriumsalz in THF gibt man 3 g (13.7 mMol) Anisylbromid und rührt etwa 6 Stunden bei Zimmertemperatur. Anschließend filtriert man von dem abgeschiedenen Natriumbromid ab und fällt in etwa 1 l Diäthyläther.

Zur Reinigung wird aus THF mit Diäthyläther umgefällt.

* Veresterung von p-Brommethylbenzoesäurechlorid mit PEG (171)

8.6 g (o.86 mMol) PEG, MG 10 000, werden in ca. 40 ml wasserfreiem Toluol gelöst, 1 g (4.28 mMol) p-Brommethylbenzoesäurechlorid und das entstehende HCl durch Einleiten von Stickstoff abgeblasen. Anschließend wird 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man läßt abkühlen und fällt mit Diäthyläther aus. Aus Methylenchlorid wird mehrmals umgefällt. Das Produkt war dünnschichtchromatographisch rein.

12. Mikrobiologische Darstellung von Huminsäure

In drei parallel geschalteten Laborkläranlagen (172) mit Belüftung, Schlammrückführung und kontinuierlichem Substratzulauf wurde ein Versuch zur Biosynthese von Huminsäure durchgeführt.

Jede Anlage wurde mit 800 ml vorbehandeltem Belebtschlamm beschickt.

Belebtschlamm:

Verwendet wurde Belebtschlamm aus der Schlammrückführung der Kläranlage Kirchentellinsfurt. Der Schlamm wurde zum vollständigen Abbau noch vorhandener Substrate zwei Stunden bei Raumtemperatur belüftet.

Anschließend spülte man ihn unter kräftigem Rühren dreimal mit Leitungswasser durch und ließ immer wieder absetzen. Der Oberstand wurde dekantiert.

Substrat:

Als Substrat verwendete man das Universal-Vollmedium TSB (Tryptic-Soy-Broth der Firma Difco-Laboratories Detroit-Michigan). In einem Vorversuch wurde TSB auf seine Ultrafiltrierbarkeit untersucht. Auf der UM-2-Membran konnten unter den üblichen Bedingungen (III.1.) keine höhermolekularen Anteile aufkonzentriert werden.

Die Substratkonzentration war 0.5 g TSB pro Liter Wasser (Nährlösung).

Die Anlagen wurden belüftet und über die Schlauchpumpe mit Substrat gespeist (5 ml Substratlösung pro min). Die Abläufe der Anlagen wurden gesammelt, sterilfiltriert und anschließend bis zur vollständigen Entsalzung ultra- und diafiltriert (III.1.).

Die Übersichtsspektren wurden am UV-Spektrograph RPQ 20 A von Zeiss aufgenommen, die Extinktionen am PMQ II Photometer von Zeiss gemessen (siehe II.10.1.).

IV. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Huminsäuren aus dem Ablauf mechanisch-biologischer Kläranlagen auf ihre Struktur untersucht.

Die angewandten Isolierungs-, Aufarbeitungs-, Fraktionierungs- und Analyse-Methoden ermöglichten erste Einblicke in den Aufbau des Grundgerüstes von Huminsäuren aus Abwasser.

Nach Abspaltung der peripheren Bausteine aus dem Huminsäure-Molekül (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Metalle) und deren quantitativer und qualitativer Bestimmung, lag der Schwerpunkt auf der Fraktionierung und der Analyse des Grundgerüstes.

Mit Hilfe der Gelchromatographie gelang eine Fraktionierung des Huminsäure-Hydrolysats in vier Struktureinheiten mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Bei der Untersuchung dieser vier Huminsäure-Untereinheiten waren herkömmliche Analysemethoden, wie Infrarotspektroskopie, UV-Spektroskopie, Röntgenstrukturanalyse, Pyrolyse GC/MS etc. wenig aussagekräftig. Entscheidend war der Einsatz der NMR-Spektroskopie. Sie gewährleistete einerseits eindeutige Aussagen über den Stand der Aufarbeitung, andererseits konnten Strukturbausteine aus dem Grundgerüst der Huminsäure identifiziert werden.

Ein Problem waren die geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen der einzelnen Fraktionen. Deshalb war zum Beispiel eine Molekulargewichtsbestimmung mit klassischen Methoden nicht möglich.

Außerdem war für die 13-C-NMR-Spektroskopie eine Spezialmeßmethode erforderlich (III.10.2.). Mit größeren Substanzmengen lassen sich das Signal/Rauschen-Verhältnis und die Auflösung der 13-C-NMR-Spektren weiter verbessern.

Durch Kombinationsvergleich der 1-H und 13-C-NMR-Spektren wurden in para-Stellung an Aromaten gebundene Äthylenoxide, Phenyläther und Alkylreste mit Carbonylfunktionen als Strukturelemente ermittelt. Die Ergebnisse konnten durch Vergleich mit Modellsubstanzen abgesichert werden.

Die identifizierten Bausteine bestätigen die Hinweise von Lindbeck, Young (173) und von Schnitzer (174), daß die aromatischen Anteile im Huminsäure-Molekül nicht als hochkondensierte Strukturen vorliegen. Vielmehr sind im Grundgerüst der Huminsäure in den aliphatischen Strukturelementen Einfachbindungen vorhanden, um die freie Rotation möglich ist.

Die Äthylenoxidbausteine, Phenylätherfunktionen und Alkylreste mit Carbonsäuregruppen können die Metallbindung im Huminsäure-Molekül erklären.

Komplexierungsversuche mit synthetischen, sauerstoffhaltigen, offenkettigen Ligandsystemen (zum Beispiel Oligoäthylenglycoläther mit Phenoläther-Endgruppen) bestätigen das. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten - im Unterschied zu den Kronenäthern-nicht auf starre Hohlräume, sondern auf flexiblere Pseudohohlräume. Dadurch kann die Komplexierung und die Dekomplexierung rascher ablaufen.

Wie Vorversuche mit Proben aus verschiedenen Anlagen (Eutingen, Steinlach-Wiesaz, Kirchentellinsfurt, Laborkläranlage) zeigen, sind die gefundenen Ergebnisse allgemein für Huminsäuren aus Abwasser charakteristisch.

Die Bildung der Huminsäure durch Mikroorganismen scheint durch den Laborsyntheseversuch bewiesen zu sein.

V. Literaturverzeichnis

1 W. Flaig, U. Schobinger und H. Deuel, Chem. Ber. 92, 1973 (1959)

2 W. Flaig, Geochim. Cosmochim. Acta 28, 1523 (1964)

3 N.A. Burges, H.M. Hurst und B. Walkden, Geochim. Cosmochim. Acta 28, 1547 (1964)

4 G. Ogner und M. Schnitzer, Can. J. Chem. 49, 1053 (1971)

5 G. Ogner, Soil Sci. 116, 93 (1973)

6 H. Raudnitz, Chem. and Ind. 12, 1650 (1957)

7 F. Scheffer und B. Ulrich, Humus und Humusdüngung, F.Enke Verlag, Stuttgart, 1960

8 R.F. Packham, Proc. Soc. Wat. Treat. Exam. 13, 316 (1964)

9 M.M. Kononova, Soil Organic Matter, 2nd English Edition, Pergamon Press, Oxford, 1966

10 K. Haider, Mushroom Sci. 7, 139 (1968)

11 F. Scheffer und P. Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart, 1970

12 M. Schnitzer in: Organic Compounds in Aquatic Environments, Editors: S.S. Faust und J.V. Hunter, Marcel Dekker, New York, 1971

13 R. Kickuth, Chem. f. Labor u. Betrieb 11, 481 (1972)
11, 540 (1972)

14 M. Schnitzer und S.U. Khan, Humic Substances in the Environment, Marcel Dekker, New York, 1972

15 R. Breng, Biolog. Rundsch. 12, 112 (1974)

16 J.C.G. Ottow, Naturwiss. 65, 413 (1978)

17 A. Szalay, Geochim. Cosmochim. Acta 28, 1605 (1964)

18 J.P. Riley und R. Chester, Introduction to Marine Chemistry, Academic Press, London, 1971

19 W. Ziechmann, Z. Anal. Chem. 181, 503 (1961)

20 W. Ziechmann und R. Kickuth, Kolloid. Z. 174, 38 (1961)

21 W. Ziechmann, Brennstoff Chem. 44, 52 (1963)

22 M.V. Cheshire, P.A. Cranwell, C.P. Falshaw, A.J. Floyd und R.D. Haworth, Tetrahedron 23, 1669 (1967)

23 G. Greene und C. Steelink, J. Org. Chem. 27, 170 (1962)

24 C. Steelink und G. Tollin, Biochem. Biophys. Acta 59, 25 (1962)

25 K. Kumada und Y. Matsui, Soil Sci. Plant Nutr. 16, 250 (1970)
26 R.D. Haworth, Soil Sci. 111, 71 (1971)
27 W. Ziechmann, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 140, 151 (1977)
28 R.L. Wershaw, D.J. Pinckney und S.E. Booker, J. Res. US. Geol. Surv. 5, 565 (1977)
5, 571 (1977)
29 M. Schnitzer und J.G. Desjardins, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 26, 362 (1962)
30 N.C. Mehta, P. Dubach und H. Deuel, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 102, 128 (1963)
31 A.M. Posner, Nature 198, 1161 (1963)
32 K.H. Schweer und D. Donnert, Kernforschungszentrum Karlsruhe 1969 UF, 1974
33 J.R. Bailly, Plant Soil 44, 49 (1976)
34 R.B. Midwood und G.T. Felbeck, J. Am. Water Works Assoc. 60, 357 (1968)
35 A.K. Burnham, G.V. Calder, J.S. Fritz, G.A. Junk, H.J. Svek und R. Willis, Analyt. Chem. 44, 139 (1972)
36 R.B. Gauntlett und R.F. Packham, Chem and Ind. 17, 812 (1973)
37 S.R. Farrah, S.M. Goyal, C.P. Gerba, C. Wallis und P.T.B. Shaffer, Water Res. 10, 897 (1976)
38 A. Richter, Druckschrift I 1514, Bayer-Werke-AG, Leverkusen, 1964
39 R. Klöcking und D. Mücke, Z. Chem. 9, 453 (1969)
40 J.P. Riley und D. Taylor, Anal. Chim. Acta 46, 307 (1969)
41 G. Kühne, Druckschrift I 20510, Bayer-Werke-AG, Leverkusen, 1970
42 N. Sridharan und G.F. Lee, Environ. Sci. Technol. 6, 1031 (1972)
43 C. Oehme und F. Martinola, Chem. and Ind. 17, 823 (1973)
44 S.H. Eberle und K.H. Schweer, Vom Wasser 41, 27 (1973)
45 S.H. Eberle, Kernforschungszentrum Karlsruhe 1731 UF, 1973
46 H. Rüffer, K.A. Möhle und J. Schilling, Vom Wasser 41, 243 (1973)
47 J.H. Weber und S.A. Wilson, Water Res. 9, 1079 (1975)
48 R.F.C. Mantoura und J.P. Riley, Anal. Chim. Acta 76, 97 (1975)

49 J. Schilling, H. Rüffer und K.A. Möhle,
Vom Wasser 46, 199 (1976)
50 H. Rüffer und J. Schilling, Vom Wasser 47, 155 (1976)
51 K.L. Cheng, Mikrochim. Acta 2, 389 (1977)
52 R. Klöcking, B. Helbig und P. Drabke,
Pharmazie 32, 297 (1977)
53 Y. Chen und M. Schnitzer, Soil Sci. 125, 7 (1978)
54 G. Ogner und M. Schnitzer, Science 170, 317 (1970)
55 R.K. Shah, M.R. Chokshi und B.C. Joshi,
Chem. Era 11, 34 (1975)
56 R.L. Wershaw, P.U. Burcar und M.C. Goldberg,
Environ. Sci. Technol. 3, 271 (1969)
57 S.U. Khan, Environ. Lett. 3, 1 (1972)
58 S.U. Khan, Residue Rev. 52, 1 (1974)
59 S.U. Khan, Am. Chem. Soc. 15, 177 (1975)
60 S.U. Khan, Adv. Environ. Sci. Technol. 8, 367 (1977)
61 U. Müller-Wegener, Naturwiss. 64, 385 (1977)
62 R.E. Grice, M.H.B. Hayes, P.R. Lundie und M.H. Cardew,
Chem. und Ind. 3, 233 (1973)
63 I.G. Burns, M.H.B. Hayes und M. Stacey,
Pestic. Sci. 4, 201 (1973)
4, 629 (1973)
64 M.H.B. Hayes, Residue Rev. 32, 131 (1970)
65 U. Müller-Wegener, Geoderma 19, 227 (1977)
66 A. Szalay, Arkiv. Mineral. Geol. 5, 23 (1969)
67 U. Förstner und G. Müller, Anorganische Schadstoffe im Neckar,
in Ruperto Carola, Zeitschrift d. Universität
Heidelberg 51, 67 (1973)
68 U. Förstner und G. Müller, Schwermetalle in Flüssen und Seen
als Ausdruck der Umweltverschmutzung, Springer Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York, 1974
69 Uferfiltration, Bericht des BMI-Fachausschusses: Wasserver-
sorgung und Uferfiltrat, 1975
70 J. Chudoba, P. Lischke und F. Tucek, Acta. Hydrochim.
Hydrobiol. 1, 397 (1973)
71 J. Chudoba, F. Tucek und P. Lischke, Z. Wasser- u. Abwasser-
Forsch. 8, 99 (1975)

72 E.T. Gjessing, Environ, Sci. Technol. 4, 437 (1970)
73 H.-D. Saier und H. Strathmann, Angew. Chem. 87, 476 (1975)
74 P. Müller, Kontakte 1, 35 (1978)
75 J.J. Alberts, J.E. Schindler, D.E. Nutter und E. Davis, Geochim. Cosmochim. Acta 40, 369 (1976)
76 T. Jakab, P. Dubach, N.C. Mehta und H. Deuel, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 96, 213 (1962)
77 T. Jakab, P. Dubach, N.C. Mehta und H. Deuel, Z. Planzenern. Düng. Bodenk. 97, 8 (1963)
78 M.V. Cheshire, P.A. Cranwell und R.D. Haworth, Tetrahedron 24, 5155 (1968)
79 J.M. Bremner, Biochem. J. 47, 538 (1950)
80 J.N. Ladd und P.G. Brisbane, Austr. J. Soil Res. 5, 161 (1967)
81 T.J. Piper und A.M. Posner, Soil Sci. 106, 188 (1968)
82 J.N. Ladd und J.H.A. Butler, Austr. J. Soil Res. 7, 241 (1969)
7, 253 (1969)
83 F.J. Sowden, Can. J. Soil Sci. 50, 233 (1970)
84 J.H.A. Butler und J.N. Ladd, Soil Biol. Biochem. 3, 249 (1971)
85 P.G. Bisbane, M. Amato und J.N. Ladd, Soil Biol. Biochem. 4, 51 (1972)
86 R.J. Morrison, J. Soil Sci. 9, 130 (1958)
87 R.E. Wildung, G. Chesters und D.E. Behmer, Plant and Soil 32, 221 (1970)
88 S.M. Griffith und M. Schnitzer, Soil Sci. 122, 191 (1976)
89 R.B. Randall, M. Benger und C.M. Groocock, Proc. Roy. Soc. A1 165, 432 (1938)
90 O.B. Maximov, T.V. Shvets und Y.N. Elkin, Geoderma 19, 63 (1977)
91 N.C. Mehta, P. Dubach und H. Deuel, Z. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 101, 147 (1963)
92 E.H. Hansen und M. Schnitzer, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 33, 29 (1969)
93 E.H. Hansen und M. Schnitzer, Fuel 48, 41 (1969)
94 J.P. Martin, K. Haider und C. Saiz-Jiménez, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 38, 760 (1974)
95 F.J. Stevenson und J. Mendez, Soil Sci. 102, 85 (1966)
103, 383 (1967)

96 P.J. Wangersky, Chimia 26, 559 (1972)
97 Marine Chemistry, National Academy of Sciences, Washington D.C., 1971
98 A. Nissenbaum und I.R. Kaplan, Limnol. Oceanogr. 17, 570 (1972)
99 A. Siegel in: Organic Compounds in Aquatic Environments, Editors: S.S. Faust und J.V. Hunter, Marcel Dekker, New York, (1971)
100 S. Dagley, Naturwiss. 65, 85 (1978)
101 H.M. Hurst, A. Burges und P. Latter, Phytochem. 1, 227 (1962)
102 K. Debosz und J. Golebiowska, Pol. Ecol. Stud. 1, 43 (1975)
103 K. Haider, E. Rietz und J.P. Martin, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 41, 556 (1977)
104 S.U. Khan und M. Schnitzer, Can. J. Chem. 49, 2302 (1971)
105 D.H.R. Barton und M. Schnitzer, Nature 198, 417 (1963)
106 H. Hellmann, M. Holeczek und H. Zehle, Vom Wasser 47, 57 (1976)
107 W. Giger und C. Schaffner, Analyt. Chem. 50, 243 (1978)
108 A. Szalay und M. Szilagyi, Geochim. Cosmochim. Acta 31, 1 (1967)
109 M.A. Rashid, Soil Sci. 111, 298 (1971)
110 B.A. Goodman und M.V. Cheshire, Nature New Biol. 244, 158 (1973)
111 B.A. Goodman und M.V. Cheshire, Geochim. Cosmochim. Acta 39, 1711 (1975)
112 P. Beneš, E.T. Gjessing und E. Steinnes, Water Res. 10, 711 (1976)
113 B.A. Goodman und M.V. Cheshire, J. Soil Sci. 27, 337 (1976)
114 A. Nissenbaum und D.J. Swaine, Geochim. Cosmochim. Acta 40, 809 (1976)
115 A. Singer und J. Navrot, Nature 262, 479 (1976)
116 F.J. Stevenson, Soil Sci. 123, 10 (1977)
117 J. Buffle, F.L. Greter und W. Haerdi, Anal. Chem. 49, 216 (1977)
118 W. Raßhofer, G. Oepen und F. Vögtle, Chem. Ber. 111, 419 (1978)
119 F. Vögtle und U. Heimann, Chem. Ber. 111, 2757 (1978)

120 G. Maas, B. Tümmler, W. Wehner, E. Weber und F. Vögtle, J. Am. Chem. Soc. 99, 4683 (1977)
121 D. Bimboes, Dissertation, Tübingen 1978
122 R. Roach und C.W. Gehrke, J. Chromatog. 52, 393 (1970)
123 R. Riffaldi und M. Schnitzer, Soil Sci. 115, 349 (1973)
124 L.C. Maillard, Compt. Rend. 66, 154 (1912)
125 G.P. Ellies, Adv. Carbohydrate Chem. 14, 63 (1959)
126 S.S. Pollack, H. Lentz und W. Ziechmann, Soil Sci. 112, 318 (1971)
127 S.A. Visser und H. Mendel, Soil Biol. Biochem. 3, 259 (1971)
128 R.L. Wershaw und D.J. Pinckney, J. Res. US. Geol. Surv. 1, 701 (1973)
129 H.L.C. Meuzelaar und P.G. Kistemaker, Anal. Chem. 45, 587 (1973)
130 O. Heisz, G-I-T, Fachz. Lab. 19, 739 (1975)
131 H.L.C. Meuzelaar, B.R. Nagar und J.P. Martin, Geoderma 17, 239 (1977)
132 L. Stieglitz und W. Leger, Kernforschungszentrum Karlsruhe 1969 UF, 1974
133 L. Stieglitz und W. Leger, Vom Wasser 45, 233 (1975)
134 B.R. Nagar, Nature 199, 1213 (1963)
135 R.L. Wershaw und G.E. Bohner, Geochim. Cosmochim. Acta 33, 757 (1969)
136 F. Martin, Z. Pflanzenern. Bodenk. 4/5, 407 (1975)
137 F. Martin, C. Saiz-Jiménez und A. Cert, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 41, 1114 (1977)
138 G.C. Levy, Topics in Carbon-13-NMR-Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York, Volume I 1974, Volume II 1976
139 E. Breitmaier und G. Bauer, 13-C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977
140 J.B. Stothers, Carbon-13-NMR-Spectroscopy, Academic Press, New York, 1972
141 D.H.R. Barton und M. Schnitzer, Nature 198, 217 (1963)
142 H.D. Lüdemann, H. Lentz und W. Ziechmann, Brennstoff Chem. 26, 506 (1973)

143 F.J.G. Vila, H. Lentz und H.D. Lüdemann, Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1063 (1976)

144 D. Stuermer und J.R. Payne, Geochim. Cosmochim. Acta 40, 1109 (1976)

145 H. Lentz, H.D. Lüdemann und W. Ziechmann, Geoderma 18, 325 (1977)

146 M.A. Wilson und K.M. Goh, J. Soil Sci. 28, 645 (1977)

147 C.H. Ludwig, B.J. Nist und J.L. McCarthy, J. Am. Chem. Soc. 86, 1186 (1964)
86, 1196 (1964)

148 H.D. Lüdemann und H. Nimz, Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1162 (1973)

149 H.D. Lüdemann und H. Nimz, Makromol. Chem. 175, 2393 (1974)
175, 2409 (1974)

150 K. Bürger, Z. Anal. Chem. 196, 251 (1963)
224, 421 (1967)

151 K. Thoma, R. Rombach und E. Ullmann, Sci. Pharm. 32, 216 (1964)

152 K. Albert, persönliche Mitteilung

153 K. Albert, Dissertation, Tübingen 1976

154 N.M. Atherton, P.A. Cranwell, A.J. Floyd und R.D. Haworth, Tetrahedron 23, 1653 (1967)

155 M.V. Cheshire, P.A. Cranwell, C.P. Falshaw und A.J. Floyd, Tetrahedron 23, 1669 (1967)

156 J.H. Reuter und E.M. Perdue, Environmental Resources Center, Completion Report ERC 0372 (1972)

157 H. Lentz und W. Ziechmann, Humus et Planta V, 241 (1971)

158 F.J.G. Vila, C. Saiz-Jiménez, H. Lentz und H.D. Lüdemann, Z. Naturforsch. 33c, 291 (1978)

159 G. Lange, Dissertation, Tübingen 1974

160 E. Bayer und G. Lange, Ger. Offen. 2 303 081 (1974)

161 W. Jäger, Dissertation, Tübingen 1975

162 H. Eberhardt, Dissertation, Tübingen 1976

163 Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie, E. Merck, Darmstadt 1970

164 D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

165 G. Pataki, J. Chromatog. 12, 541 (1963)

166 A. Guinier und G. Fournet, Small-angle Scattering of X-rays, John Wiley and Sons, New York, 1955

167 H. Lentz und W. Ziechmann, Brennstoff Chem. 49, 40 (1968) 49, 154 (1968)

168 R.S. Cameron, B.K. Thornton, R.S. Swift und A.M. Posner, J. Soil Sci. 23, 394 (1972)

169 H.R. Schulten und H.M. Schiebel, Naturwiss. 65, 223 (1978)

170 Handbook of Chemistry and Physics, The Chemical Rubber Company, Cleveland (Ohio), 53 rd Edition 1972-1973

171 H. Albrecht, Dissertation, Tübingen 1978

172 R. Wagner, Vom Wasser 40, 335 (1973)

173 M.R. Lindbeck und J.L. Young, Soil Sci. 101, 366 (1966)

174 Y. Chen und M. Schnitzer, Soil Sci. Soc. Am. Proc. J. 40, 866 (1976)

Lebenslauf

Wolf Bergmann, geboren am 19.1.1946 in Halle/Saale. Sohn der Chemotechnikerin Brigitte Bergmann.

1952-1956	Besuch der Volksschule in Hann-Münden
1956-1957	Besuch der Phillipp Murray Public School in Chicago, USA
1958-1966	Besuch des Staatlichen Gymnasiums in Kaufbeuren/Allgäu bis zum Abitur
1966-1968	Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr
1968-1975	Biochemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen mit Abschluß Diplom
1975	Isolierung und Identifizierung von Metaboliten carcinogener N-Nitrosoverbindungen am Hygiene-Institut der Universität Tübingen bis Januar 1976
Februar 1976- Juli 1978	Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation "Zur Strukturaufklärung von Huminsäuren aus Abwasser" unter Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

A. Anderer, E. Bayer, H. Diekmann, W. Frank, J. Gelinek, A. Gottschalk, A. Grahle, K.G. Grell, J. Guglielmi, W. Harder, G. Kortüm, H. Krüger, H. Mauser, H. Metzner, K. Mörike, E. Müller, G. Opitz, H. Pape, K. Pelling, M. Richter, W. Rüdorff, F.F. Seelig, H. Seiler, H. Schenk, E. Schwartz, W. Schweitzer, E. Stumpp, K. Wegmann, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner, K. Zetsche.